

FEINSTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BEWEGUNG DES
MOUGEOTIA-CHLOROPLASTEN

von

Karin Klein, geb. Weigang

aus

Nürnberg

1981 № 357



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FEINSTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEWEGUNG DES MOUGEOTIA-CHLOROPLASTEN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Karin Klein, geb. Weigang

aus

Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung:

30. Juni 1981

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. G. Wagner

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. W. Haupt

Folgende Abkürzungen werden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

APM	Amiprophosmethyl
ATP	Adenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
HMM	heavy meromyosin
MES	2(N-Morpholino)ethane sulfonic acid
NEM	N-äthylmaleimid
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PCMB	p-Chlormercuribenzoat

Liste der in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen

C	Cytoplasma
Chl	Chloroplast
co C	corticales Cytoplasma
Cyt	Cytosom
D	Dictyosom
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Fil	Mikrofilamente
K	Kern
Lw	Längswand
M	Membran
Mit	Mitochondrium
Mt	Mikrotubuli
Nk	Nukleolus
P	Pyrenoid
Pl	Plasmalemma
pl C	plastidäres Cytoplasma
Qw	Querwand
R	Ribosomen
S	Schleimschicht
Sr	Stroma
St	Stärke
Thy	Thylakoide
Tp	Tonoplast
Ü	Übergangsbereich
V	Vesikel
Vak	Vakuole
W	Zellwand
Z	Zisternen

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.01. Dauerkultur von Mougeotia	8
2.02. Massenkultur von Mougeotia	9
2.03. Chemische Fixierung	9
2.04. Elektronenmikroskopische Präparation	13
2.05. Rekonstruktion der Mikrofilament-Verteilung in Mougeotia-Zellen	14
2.06. Rekonstruktion der Cytosomen- und Mitochondrien-Verteilung in Mougeotia-Zellen	15
2.07. THIÉRY-Versuche zum Polysaccharidnachweis	17
2.08. Protein-Eluation und HMM-Infiltration zur Aktin-Identifizierung in Mougeotia-Zellen	17
2.09. Herstellung von Mougeotia-Protoplasten	18
2.10. Aktin-Identifizierung durch HMM-Dekorierung an gespreiteten Mougeotia-Protoplasten und Trennung des Aktin-HMM-Komplexes durch ATP (ATP-Kontrolle)	19
2.11. Statistische Auswertung	21
3. ERGEBNISSE	22
3.01. Vorversuche zur allgemeinen Zellmorphologie von Mougeotia und Abwägung geeigneter Fixierungsmethoden	22
3.02. Mikrofilamente und ihre Darstellung bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden	58
3.03. Rekonstruktion typischer Chloroplasten-Gestaltsänderungen während der Bewegung	73
3.04. Führung einer Chloroplastenkante während der Bewegung	80
3.05. Rekonstruktion der Mikrofilament-Verteilung in Mougeotia-Zellen	82
3.06. Rekonstruktion der Cytosomen- und Mitochondrien-Verteilung in Mougeotia-Zellen	91
3.07. Beeinflussung der Motorik des Mougeotia-Chloroplasten durch physiologisch aktive Substanzen	98
3.08. Protein-Eluation und HMM-Infiltration zur Aktin-Identifizierung in Mougeotia-Zellen	104
3.09. Aktin-Identifizierung durch HMM-Dekorierung an gespreiteten Mougeotia-Protoplasten und Trennung des Aktin-HMM-Komplexes durch ATP (ATP-Kontrolle)	110
4. DISKUSSION	124
4.01. Erörterung der allgemeinen Zellmorphologie von Mougeotia und verschiedener Fixierungsmethoden	124
4.02. Mikrofilamente und ihre Darstellung bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden	130
4.03. Beziehungen der Mikrofilamente zum Bewegungsapparat	137

4.04.	Steuerung der Chloroplastenbewegung	147
4.05.	Protein-Eluation und HMM-Infiltration zur Aktin-Identifizierung in Mougeotia-Zellen	151
4.06.	Aktin-Identifizierung durch HMM-Dekorierung an gespreiteten Mougeotia-Protoplasten und Trennung des Aktin-HMM-Komplexes durch ATP (ATP-Kontrolle)	153
5.	ZUSAMMENFASSUNG	156
6.	LITERATURVERZEICHNIS	157

1. EINLEITUNG

Die fädige Grünalge *Mougeotia* besitzt pro Zelle einen einzelnen, plattenförmigen Chloroplasten, der sich in der zylindrischen Zelle lichtabhängig orientiert: im Licht niederer bis mittlerer Intensität oder im Rotlicht weist er dem Licht seine Breitseite zu; im Weißlicht hoher Intensität oder im blauen Licht wendet er dem Licht dagegen die Schmalseite zu.

Beide Orientierungsbewegungen des Plastiden werden nach gültiger Auffassung über das Phytochromsystem gesteuert (HARTMANN und HAUPT 1977). Somit ist diese Zellreaktion ein weiterer Ausdruck der vielfältigen Steuerfunktionen, die dieses Photorezeptorsystem bei grünen und potentiell grünen Pflanzen übernommen hat (HARTMANN und HAUPT 1977). Trotz aller Vielfältigkeit lassen sich die phytochromabhängigen Reaktionen in zwei Gruppen einteilen. Einerseits steuert Phytochrom Langzeitreaktionen wie z.B. Samenkeimung und Photomorphogenese von *Sinapis* (MOHR 1972) oder die Samenkeimung von *Lactuca sativa* (HARTMANN und HAUPT 1977). Dies geschieht vermutlich über eine differentielle Genaktivierung, die korrekter als differentielle Photoregulation der Gene (HARTMANN und HAUPT 1977) bezeichnet wird. Andererseits findet man schnelle Phytochromreaktionen, für die sich aufgrund ihrer Kürze ein unterschiedlicher Wirkungsmechanismus anbietet, vermutlich eine Änderung von Membranparametern, wie etwa des Membranpotentials.

Mougeotia kann als ein Modellsystem zur Untersuchung von phytochromabhängigen Kurzzeitreaktionen betrachtet werden, da hier, ähnlich wie bei *Mesotaenium*, die Wirkung des Phytochromsystems (Chloroplastenbewegung) innerhalb von Minuten zum Ausdruck kommt und auf zellulärem Niveau untersucht werden kann. Vermutlich ist die Reaktionskette zwischen Lichtperzeption und

Plastidenbewegung sehr kurz (WAGNER 1974; HAUPT und ÜBEL 1975).

Der derzeitig vorzuschlagende Reaktionsablauf kann folgendermaßen schematisiert werden (siehe HAUPT 1980):

Photo-	Signal-	chemo-mechanischer	Plastiden-
Rezeptor	wandler	Transducer	bewegung

Photobiologische Fragestellungen zum Photorezeptor Phytochrom wurden von HAUPT und Mitarbeitern intensiv untersucht. Punktlichtversuche bewiesen, daß der Photorezeptor im peripheren Cytoplasmabereich, vermutlich am Plasmalemma lokalisiert ist. Nach einem detailliert ausgearbeiteten Modell liegen die Phytochrommoleküle als P_r mit ihrer dichroitischen Hauptabsorptionsachse parallel zur zylindrischen Zelloberfläche in einer Linksschraube. Durch Absorption von Licht der Wellenlänge um 660 nm wird das physiologisch inaktive Phytochrom, P_r , in die physiologisch aktive Form, P_{fr} , umgewandelt. Hierbei dreht sich die Hauptabsorptionsachse der Phytochrommoleküle um 90° (HAUPT 1968). Aufgrund der dichroitischen Rezeptoranordnung innerhalb der zylindrischen Zelle entsteht ein tetrapolarer P_{fr} -Gradient, innerhalb dessen sich der Chloroplast orientiert.

Der Wirkungsmechanismus der Plastidensteuerung durch P_{fr} ist unbekannt. Jedoch spricht einiges dafür, daß Calcium eine wichtige Rolle bei der Umwandlung des Signals "Licht" in eine zelluläre Antwort spielt. So konnte die Abhängigkeit der Plastidenbewegung von einer intrazellulären Fraktion schwerlöslichen Calciums gezeigt werden (WAGNER und BELLINI 1976; WAGNER und KLEIN 1978). Ferner wurden Cytosomen der Mougeotia-Zelle mit Hilfe röntgenmikroanalytischer und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen als Speicher schwerlöslichen Calciums identifiziert (WAGNER und ROSSBACHER 1980). DREYER und WEISENSEEL (1979) berichten von einem phytochromabhängigen Calcium-Transport durch das Plasmalemma bei Mougeotia.

Im Vergleich zur Photobiologie und zum Ionen-Haushalt der Mougeotia-Zelle ist wenig über den chemo-mechanischen Transducer der Chloroplastenbewegung bekannt: SCHÖNBOHM wies 1969 nach, daß der Sulfhydryl-Gruppen-Blocker PCMB die orientierte Chloroplastenbewegung von Mougeotia hemmt. Er schloß auf fibrilläre Elemente, welche er für die Chloroplastenverlagerung verantwortlich macht. 1971 konnte FOOS durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mougeotia fibrillöse Strukturen aufzeigen. WAGNER fand 1972, daß Cytochalasin B, ein Hemmstoff kontraktiler Proteinfibrillen (siehe SPOONER und WESSELS 1970; WESSELS et al. 1971; BRADLEY 1973, WEBER et al. 1976), die Motorik der Schwachlicht-Bewegung blockiert; der photobiologische Primärprozess wird durch Cytochalasin B nicht beeinflußt (WAGNER et al. 1972). WAGNER schloß deshalb, daß "an der Bewegung des Mougeotia-Chloroplasten ... offenbar kontraktile Proteinfibrillen ... beteiligt" sind.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis der Aktin-Natur dieser Fibrillen. Es soll dadurch die Vermutung bestätigt werden, daß es sich bei dem chemo-mechanischen Transducer um Aktin, bzw. Aktomyosin handelt.

Aktin als Strukturprotein tritt bereits bei primitiven Organismen wie Amöben auf und zeigt seine höchste Entwicklungsstufe im quergestreiften Muskel. Es gibt sogar Hinweise auf die Existenz von Aktin in Bakterien (SOMEYA und TANAKA 1979). Während das Vorhandensein und die Funktion von Aktin beim Schleimpilz Physarum polycephalum bereits seit längerem untersucht wird (WOHLFARTH-BOTTERMANN 1964; KAMIYA und KURODA 1965; NAGAI und KAMIYA 1966; KAMIYA 1968; KOMNICK et al. 1970; NACHMIAS et al. 1970; ALLERA et al. 1971), ist das Wissen um Aktin bei grünen Pflanzen spärlich, wenn man von den Characeen (PALEVITZ et al. 1974; WILLIAMSON 1974), Vaucheria (BLATT et al. 1980a,b) und einigen Amaryllidaceen

(CONDEELIS 1974; FORER und JACKSON 1975, 1976) absieht. Dies liegt teilweise an der Schwierigkeit, aktinähnliche Mikrofilamente während der elektronenmikroskopischen Präparation zu erhalten. Ferner treten Mikrofilamente bei Pflanzen häufig in vergleichsweise geringer Menge auf (WILLIAMSON 1976).

Deshalb gelang erst bei wenigen pflanzlichen Objekten der direkte Aktin-Nachweis durch Dekorierung mit heavy meromyosin (HMM).

Dieser Nachweis wurde 1969 von ISHIKAWA eingeführt und basiert auf Arbeiten von H.E. HUXLEY (1963) über die Bindung von Kaninchenmuskel-HMM an isoliertes Kaninchen-Aktin (siehe WAGNER 1979).

Das heavy meromyosin, das den Kopfteil des Myosins mit ATPase-Aktivität enthält, lagert sich in einem Winkel von annähernd 45° an das polar gebaute Aktinfilament. Aufgrund dieser periodischen Ausrichtung im gleichen Winkel entsteht der Eindruck eines Pfeilspitzenmusters; dieses "arrow head pattern" kann im elektronenoptischen Bild leicht nachgewiesen werden. WOHLFARTH-BOTTERMANN und Mitarbeiter wandten diese Methode erstmals an einem pflanzlichen Objekt an (ALLÈRA, BECK und WOHLFARTH-BOTTERMANN 1971); sie identifizierten filamentöses Aktin im Plasmodium des Schleimpilzes *Physarum polycephalum* mit Hilfe von Kaninchen-HMM. Es erscheint bemerkenswert, daß tierisches HMM auch mit pflanzlichem Aktin reagiert. Dies ist möglich, weil sich Myosin und - im besonderen Maße - Aktin während der Evolution wenig veränderten. Die Aminosäuresequenz von Aktinen verschiedener tierischer und pflanzlicher Herkunft ist nahezu identisch (KORN 1978; WAGNER 1979). Interessant sind in dieser Hinsicht Versuche von D'HAESE und HINSSSEN (1978), wonach gereinigtes Schleimpilzaktomyosin in vitro das gleiche Kontraktionsverhalten zeigt wie Muskelaktomyosin bei vergleichbarer, geringer Struktur-

ordnung. Dies gilt auch für Hybride beider Partner. Der Schluß liegt nahe, daß der molekulare Kontraktionsprozess von Cytoplasma-Aktomyosin und Muskel-Aktomyosin identisch ist.

Die einzelnen Objekte unterscheiden sich nicht im molekularen Mechanismus der Kontraktion, sondern in der Art und Weise, wie Kontraktion in zelluläre oder intrazelluläre Bewegung umgewandelt wird. Während bei *Physarum polycephalum* Kontraktion ektoplasmatischer Fibrillen über einen Druckflußmechanismus die Pendelströmung erzeugt, interagiert bei *Nitella* Myosin im Endoplasma mit den stationären Aktinfibrillen des Ektoplasmas und erzeugt auf diese Weise Scherkräfte.

Der Bewegungsmechanismus des *Mougeotia*-Chloroplasten ist unbekannt. 1974 stellte WAGNER die Hypothese auf, daß kontraktile Fibrillen irisblendenartig im wandnahen Cytoplasma liegen, am Plasmalemma verankert sind und zum Plastiden bzw. Tonoplasten ziehen. " P_{fr} soll hypothetisch auf die Fibrillen desaktivierend wirken. Dies hätte zur Folge, daß ... bei Einstellung von P_{fr} an den Stirnseiten nur die mit dem Plasmalemma der Flanken verknüpften Fibrillen aktiv bleiben, sich kontrahieren und folglich den Chloroplasten in Flächenstellung ziehen, bis erneut Kräftegleichgewicht herrscht."

In diesem Modell ist bereits das Problem der Bewegungssteuerung angesprochen, das bei *Mougeotia* besonders diffizil ist. Während z.B. die Rotationsströmung bei *Chara* monoton bis zum Zelltod abläuft, ist die Plastidenbewegung bei *Mougeotia* räumlich und zeitlich genau definiert. Die Bewegung stoppt, sobald die Endstellung erreicht ist, d.h. sobald die Plastidenkanten den Ort niedrigster P_{fr} -Konzentration, die Flanke, erreicht haben. Die faszinierende Exaktheit der Bewegung zeigt, daß *Mougeotia* nicht nur zur Untersuchung der Phytochromproblematik gut geeignet ist, sondern darüber hinaus auch eine Fülle vielversprechender Fragestellungen zum Aktomyosinsystem und seiner Steuerung birgt.

In dieser Arbeit können nur einige wenige Aspekte untersucht werden.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist die überzeugende Strukturaufklärung der Mikrofilamente durch Dekoration mit HMM.

Dies allein reicht aber nicht aus, um Aussagen über den Bewegungsmechanismus des Plastiden machen zu können. Deshalb soll auch die funktionelle Beziehung der Mikrofilamente untereinander, zum Plastiden und zu anderen Zellstrukturen in ersten Ansätzen untersucht werden. Um Rückschlüsse auf die Funktion der Mikrofilamente ziehen zu können, ist es interessant, wie die Mikrofilamente der Mougeotia-Zelle in bezug auf den Chloroplasten verteilt sind. Dies setzt aber voraus, daß Fixierungsmethoden erarbeitet werden, die eine gute Strukturhaltung sowohl der Mikrofilamente als auch der gesamten Mougeotia-Zelle garantieren.

Als bewegungserzeugende Strukturen entwickeln Mikrofilamente Kräfte, die sich eventuell an Verformungen des Chloroplasten indirekt nachweisen lassen.

Setzt man voraus, daß Calcium auch bei Mougeotia das Aktomyosinsystem steuert, so ist es reizvoll, die räumliche Beziehung von Cytosomen und Mitochondrien zum Plastiden zu untersuchen. Denn es ist bekannt, daß die Schwachlichtbewegung des Mougeotia-Plastiden mit dem zellulären Gehalt an schwerlöslichem Calcium korreliert (WAGNER und KLEIN 1978) und daß in den Mougeotia-Cytosomen schwerlösliches Calcium gespeichert wird (WAGNER und ROSSBACHER 1980).

Die Lage der Mitochondrien ist insofern interessant, als die im Dunkeln ablaufende, durch kurze Belichtung induzierte Schwachlichtbewegung durch die oxidative Phosphorylierung energetisch gespeist wird (FETZER 1963). Physiologisch aktive Substanzen, die die Myosin-ATPase

hemmen (N-Äthylmaleimid) bzw. die Polymerisations- und Depolymerisationsvorgänge des Aktins beeinflussen (Phalloidin) oder in den Calcium-Haushalt eingreifen (Amiprophosmethyl), sollen in bezug auf ihre strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf das Bewegungssystem bei Mougeotia untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.01. Dauerkultur von Mougeotia

Die Grünalge *Mougeotia spec.* wird seit Jahren im Botanischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg kultiviert (vgl. HAUPT 1968). Die Anzucht erfolgte in ENS:

100 ml Erddekot
100 mg NaNO_3
100 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$
ad 1000 ml aqua dest.

Die Algen wuchsen in Petrischalen mit ca. 20 ml Nährlösung, die alle 14 Tage erneuert wurde. Die gebotene Weißlichtintensität betrug bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h (7^{OO} - 19^{OO}) ca. 400 Lux. Die Temperatur im Kulturraum wurde bei $16 \pm 1^\circ\text{C}$ konstant gehalten. *Mougeotia* vermehrte sich reichlich und hatte gut ausgebildete Chloroplasten.

Zur besseren Standardisierung des Ionenmilieus wurde häufig das rein anorganische MXS-Medium (NEUSCHELER-WIRTH 1970) dem ENS-Medium vorgezogen:

1,00 mmol l^{-1} KNO_3
0,25 mmol l^{-1} CaCl_2
0,20 mmol l^{-1} KH_2PO_4
0,20 mmol l^{-1} MgSO_4
0,09 mmol l^{-1} Fe^{++} -EDTA
0,27 mmol l^{-1} KHCO_3

Diese Lösung wurde mit ca. 5 ml 0,01 normaler KOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

2.02. Massenkultur von Mougeotia

Zur Anzucht größerer Mougeotia-Mengen wurde die Durchlüftungskultur nach STABENAU (1978) in leicht modifizierter Form angewandt:

5,00 mmol l⁻¹ KNO₃
4,50 mmol l⁻¹ NaH₂PO₄
0,50 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄
0,25 mmol l⁻¹ MgSO₄
0,10 mmol l⁻¹ CaCl₂
0,025 mmol l⁻¹ FeSO₄
1 ml/l Spurenelementlösung (WARIS 1953)
1 ml/l Vitaminstammlösung

10 ml Vitaminstammlösung enthalten 10 mg Vitamin B₆ und 0,05 mg Vitamin B₁₂.

Die Algen wuchsen bei 24 °C unter Dauerlicht von ungefähr 3000 Lux in 1-Liter-Anzuchtskolben, durch die Luft mit 2 % CO₂ geleitet wurde. Die Algen vermehrten sich unter diesen Bedingungen außerordentlich rasch und besaßen gut ausgebildete Chloroplasten.

2.03. Chemische Fixierung

Es wurden verschiedene Verfahren ausprobiert, um speziell für Mougeotia die günstigsten Fixierungsbedingungen zu finden.

Fixantien:

Als Fixantien dienten Glutaraldehyd, Osmiumtetroxid und Acrolein. Am häufigsten wurden Glutaraldehyd (0,5-6 %) und Osmiumtetroxid (0,5-1 %) simultan verwendet. Weiterhin wurde mit Acrolein und Osmiumtetroxid als Fixierungsgemisch oder nur mit Glutaraldehyd bei der Vorfixierung experimentiert.

Puffer:

Als Puffer wurde häufig, insbesondere für Simultanfixierungen, das Kulturmedium MXS verwendet. Cacodylat-, Collidin-, Trismaleat- und Kaliumphosphat-Puffer wurden ebenfalls eingesetzt. Der pH-Wert wurde zwischen 6,0 und 7,4 variiert. Die Fixierungsdauer betrug normalerweise ungefähr zwei Stunden, wurde jedoch bei einigen Experimenten auf 24 Stunden verlängert. Es wurde mit einer Ausnahme immer auf Eis fixiert.

Entwässerung:

Die Proben wurden in einer aufsteigenden Äthanolreihe entwässert; der absolute Alkohol wirkte ungefähr 12 Stunden ein. Anschließend wurde ca. drei Stunden lang nochmals mit Propylenoxid entwässert.

Einbettung:

Als Einbettungsmittel diente das Epoxidharz Spurr's low viscosity medium mittlerer Härte (SPURR 1969). Das Einbettungsmittel war für jeden Versuch frisch angesetzt. Die Algen wurden zunächst aus dem Propylenoxid in ein Gemisch aus Einbettungsmittel und Propylenoxid überführt. Anschließend wurden sie in reinem Einbettungsmittel unter leichtem Rühren inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 6-7 Stunden; das Medium wurde in dieser Zeit mehrmals gewechselt.

Orientierung der Algenfäden und Polymerisation des Epoxidharzes:

Für gut auszuwertende Quer- und Längsschnitte war es wichtig, daß die Algenfäden im Präparat eine Vorzugsrichtung zeigten. Deshalb wurde wie folgt vorgegangen. Einer Aluminiumfolie wurde mittels eines Gitters kleine, flache Mulden eingedrückt. Kleine Algenbüschel wurden aus dem reinen Einbettungsmittel in diese Mulden überführt und mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet. Mit einem Tropfen Spurr-Medium wurden die Mulden jeweils aufgefüllt. Außerdem wurden kleine Gelatine kapseln

nur mit Einbettungsmittel gefüllt; sie enthielten keine Algenfäden. Bei 60 °C war das Spurr-Medium nach zwei Tagen auspolymerisiert. Die Gelatine kapsel wurde mit warmem Wasser entfernt und in das leere Blöckchen aus Epoxidharz wurde ein Spalt eingesägt, in dem die auspolymerisierten Blättchen mit den Algenfäden eingeklemmt wurden. Der verbleibende Hohlraum wurde mit Einbettungsmittel aufgefüllt und die derart präparierten Blöckchen wurden nochmals zwei Tage lang bei 60 °C belassen (siehe Skizze).

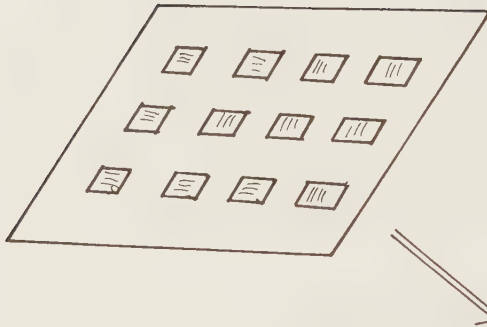
Abänderung des üblichen Fixierungsverfahrens:

Für einige Fragestellungen mußte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, während aller Arbeitsschritte bis hin zur fertigen Photographie die Einfallsrichtung des Lichtes festzuhalten, das ursprünglich zur Bewegungsinduktion verwendet worden war.

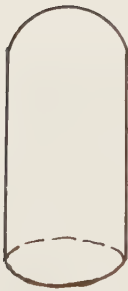
Die Algen wurden hierzu in 1-1,5 %igem MXS-Agar eingebettet. Diese Substanz wurde trotz experimenteller Schwierigkeiten gewählt, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß andere Medien sich nicht eigneten. In Polyacrylamid z.B. starben die Mougeotia-Zellen sofort ab. Da nach Angaben von FOOS (1971) damit gerechnet werden mußte, daß die Wärme des flüssigen Agars die Zellmorphologie verändert, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Der Boden einer kleinen, gläsernen Petrischale wurde dünn mit Agar bedeckt und gekühlt. Auf diese Agarschicht wurden einige Zellfäden gelegt und mit einem Tropfen gerade noch flüssigen Agars bedeckt und sofort mit gekühlter MXS-Lösung überschichtet. Auf diese Weise sollte die Wärme schnell abgeführt werden. Den Algen wurde noch 3-5 Tage Zeit gegeben, um sich von etwaigen Schäden zu erholen. Mougeotia zeigte auch im MXS-Agar gutes Längen- und Teilungswachstum (siehe auch NEUSCHELER-WIRTH 1970).

Skizze:



Alufolie mit
längs- und quer
ausgerichteten
Algenfäden in
Mulden



leeres
Epoxidblöck-
chen



leeres
Epoxidblöck-
chen mit
eingesägtem
Schlitz



zusätzlich aus-
polymerisierter
Epoxidtropfen mit
Algen in Schlitz
eingeklemmt und
mit Epoxidharz in
dieser Lage fixiert

Die Plastiden der Mougeotiazellen wurden vor Versuchsbeginn durch seitliche Weißlicht-Belichtung auf Kantenstellung gerichtet. Anschließend wurden die Präparate 60 Sekunden mit Rotlicht von $3,3 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ belichtet. Als Filter diente das Farbglas OG 590. 10, 20, 30 und 40 Minuten nach Induktion wurden die Algen wie üblich fixiert und entwässert. Um die längeren Diffusionszeiten im Agar in etwa zu kompensieren, wurden die Zeitabschnitte der einzelnen Präparationsschritte verdoppelt. Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß die Fixiermittel Osmiumtetroxid und Glutaraldehyd genügend schnell und in ausreichender Menge für eine zufriedenstellende Fixierung in die Zelle eingedrungen sind.

Nachdem die Präparate in dem flüssigen Einbettungsmittel inkubiert worden waren, wurden kleine Stücke des Agars ausgeschnitten und in Flacheinbettungsschalen⁺ gelegt. Die Oberseite des Agarstückes entsprach dabei der Lichteinfallrichtung und wurde auch in den Einbettungsschalen beibehalten. Die Mulden wurden mit Einbettungsmittel aufgefüllt. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Blöckchen parallel zur geraden Unterkante getrimmt. Beim Schneiden wurde ebenfalls die Messerkante parallel zur Unterkante der Schnittfläche geführt. Auf diese Weise konnte selbst noch im Elektronenmikroskop die Lichteinfallrichtung rekonstruiert werden.

2.04. Elektronenmikroskopische Präparation

Die Epoxidharz-Blöckchen wurden mit der Trimmvorrichtung TM 60 (Reichert, Wien) in Form eines Pyramidenstumpfes zugespitzt. Ultradünnschnitte wurden auf dem Ultra-

⁺Frau Prof.Dr.R.Hofer sei herzlich für die Überlassung der Flacheinbettungsschalen gedankt.

mikrotom OmU₂ von Reichert mit Hilfe selbst hergestellter Glasmesser oder mit einem Diamantmesser (Friedrich Dehmling, Bad Aibling) angefertigt. Die Schnittdicke wurde so gewählt, daß die Interferenzfarbe silbergrau bis golden war. Die Schnitte wurden im Wassertrog des Messers mit Xyloldampf gestreckt, um die während des Schneidens entstandenen Stauchungen in Schnittrichtung rückgängig zu machen. Die auf der Wasseroberfläche flottierenden Schnittbänder wurden auf Kupferlochblenden oder Kupfernetzchen (Veco, Solingen) aufgezogen, die vorher mit Formvar- oder Pioloform befilmt worden waren. Die Schnitte wurden 5-10 Minuten lang in einer 10 %igen (g/v) Lösung von Uranylacetat in Methanol kontrastiert und anschließend mit Methanol, mit einem Gemisch aus Methanol und aqua bidest. und schließlich mit reinem aqua bidest. gespült. Daraufhin wurden die Schnitte 5 Minuten in 0,2 %iger (g/v) Bleicitrat-Lösung nach VENABLE und COGGESHALL (1965) nachkontrastiert. Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiss EM 10 Transmissionselektronenmikroskop (Oberkochen) ausgeführt.

2.05. Rekonstruktion der Mikrofilament-Verteilung in Mougeotia-Zellen

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Lage, Menge und Verteilungsdichte von Mikrofilamentbündeln innerhalb von Mougeotiazellen zu bestimmen.

Hierzu wurden 21 Zellstichproben verwendet. Die Schnitte wurden im Elektronenmikroskop systematisch nach Mikrofilamenten untersucht und deren Vorkommen in einer Skizze festgehalten. Jede Fibrille wurde einzeln fotografiert, sowie der Zell-Querschnitt als ganzes. Mit Hilfe des automatischen Bildauswertegerätes Digiplan-MOP (Kontron, München)⁺ wurde die Fläche der ange-

⁺Für die Benutzung dieses Gerätes möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr.K.P.Gaffal recht herzlich danken.

schnittenen Bündel ausgemessen und auf die Einheit μm^2 umgerechnet.

Durch die Protokollierung am EM war es nun möglich, die Fibrillen den drei Bereichen, corticales Cytoplasma, plastidenumgebendes Cytoplasma, sowie dem Übergangsbereich zwischen corticalem und plastidärem Cytoplasma zuzuordnen. Da diese drei Cytoplasmaabschnitte unterschiedlich groß sind, wurde zusätzlich an jedem Querschnitt die Länge des corticalen und plastidären Cytoplasmas gemessen, sowie die Länge des Cytoplasmas, das im Kontaktbereich der Plastidenkante liegt ($\hat{=}$ Übergangsbereich). Bei der Längenmessung des Übergangsbereiches wurde nach folgenden Kriterien vorgegangen:

Es wurde die Strecke zwischen den zwei äußersten Berührungspunkten der Plastidenkante mit dem randständigen Cytoplasma gemessen (siehe Skizze a).

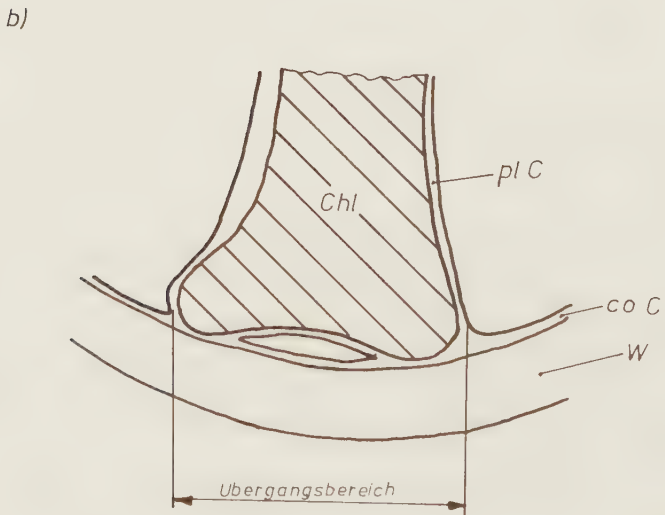
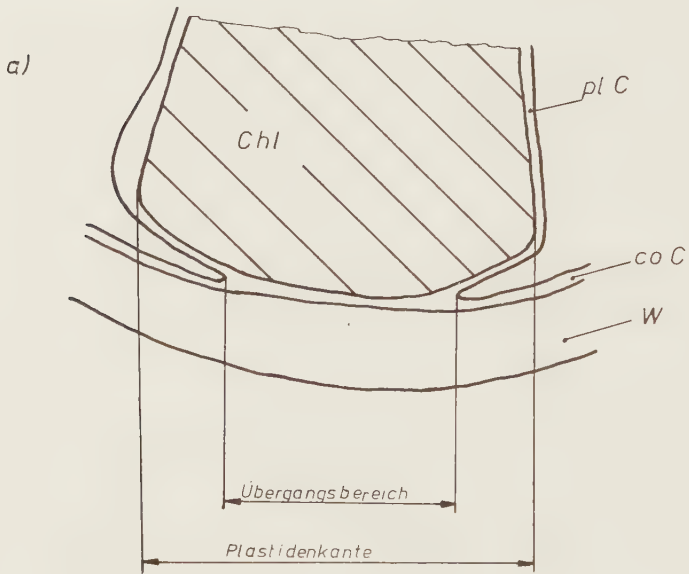
Tritt der Chloroplast innerhalb der Kontaktzone wieder vom randständigen Cytoplasma zurück, wie es manchmal bei gelappten Chloroplasten der Fall ist, so gilt das gesamte Cytoplasma zwischen den zwei äußersten Berührungspunkten der Plastidenkante mit dem randständigen Cytoplasma als "Übergangsbereich".

Die Fläche der ausgemessenen Fibrillen konnte nun auf die jeweils zugehörige Cytoplasmalänge bezogen werden.

2.06. Rekonstruktion der Cytosomen- und Mitochondrien-Verteilung in Mougeotia-Zellen

Für diese Versuchsreihe wurde die Länge der Cytoplasma-Abschnitte nach den oben erwähnten Kriterien gemessen. Die Organelle konnten an stärker vergrößerten Übersichtsaufnahmen ausgewertet werden.

Detailzeichnung eines Zellquerschnittes



2.07. THIÉRY-Versuche zum Polysaccharidnachweis

Um eine Aussage über die stoffliche Natur bestimmter Chloroplasteneinlagerungen und der Zellwand zu erhalten, wurden Schnitte von Glutaraldehyd-fixierten Mougeotia-Zellen nach der Methode von THIÉRY (1967) behandelt. Sie erlaubt den Nachweis von Polysacchariden wie Stärke oder Zellulose.

Die Schnitte wurden 20 Minuten mit Perjodsäure behandelt; daraufhin dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie 30 Minuten lang in 10 %iger Essigsäure mit Zusatz von 1 % Thiosemicarbazid inkubiert und mit Lösungen fallender Essigsäurekonzentrationen gespült. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden sie im Dunkeln in 1 %iger Silberproteinat-Lösung inkubiert und kurz mit aqua dest. gespült.

2.08. Protein-Eluation und HMM-Infiltration zur Aktin-Identifizierung in Mougeotia-Zellen

Für den Nachweis, daß es sich bei intrazellulären Mikrofilamenten um Aktin handelt, gilt als Standardmethode die Dekorierung mit heavy meromyosin, HMM. Für eine Dekorierung in situ muß die Zelle zuerst mit membranlysisierenden Substanzen behandelt werden, damit lösliche Zellbestandteile eluiert werden und HMM eindringen kann. Üblicherweise wird hierzu Glycerin eingesetzt.

Glycerin wurde in Konzentrationen von 50-1 % (v/v) in Tris-Maleat-Puffer $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, MgCl_2 $0,005 \text{ mol l}^{-1}$, KCl $0,05 \text{ mol l}^{-1}$, pH 7, verwendet (ALLÉRA et al. 1971). Die Inkubationsdauer variierte zwischen drei Stunden

⁺Für die Gabe von gereinigtem Kaninchen-HMM sei Herrn Prof.Dr.K.E.Wohlfarth-Bottermann und Herrn Dr.H.Hinssen besonders gedankt.

und mehreren Tagen. Die Temperatur betrug etwa + 4 °C; bei mehrstündiger Versuchsdauer wurden die Versuchsansätze im Eisfach des Kühlschranks aufbewahrt. Bei einigen Versuchen wurde der Glycerinierungslösung Phalloidin in einer Konzentration von 50-100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ zugegeben, um eine Polymerisation des G-Aktins und einen Schutz der bereits in vivo vorhandenen Aktin-fibrillen zu erreichen. Nach der Glycerinierung erfolgte die Entglycerinierung innerhalb einer Stunde in 4-5 Schritten mit Tris-Maleat-Puffer 0,01 mol l^{-1} , MgCl_2 0,005 mol l^{-1} , KCl 0,05 mol l^{-1} , pH 7.

Anstelle von Glycerin wurde auch Äthanol in Konzentrationen von 2-5 % (v/v) bei Zimmertemperatur getestet.

Als membranlysierende Substanz wurde auch Triton X 100 in einer Konzentration von 0,1 % (v/v) verwendet (SCHLIEPER und DE ROBERTIS 1977). Die Inkubationsdauer variierte zwischen einer halben und zwei Stunden.

HMM-Dekoration:

Nach gründlichem Entfernen des Glycerins, Äthanolis oder Tritons wurden die Algen in Tris-Maleat-Puffer 0,01 mol l^{-1} , MgCl_2 0,005 mol l^{-1} , KCl 0,05 mol l^{-1} , pH 7, mit 2 mg HMM/ml überführt. Bei allen in situ-Nachweisen von Aktin wirkte die HMM-Lösung über Nacht ein. Überschüssiges HMM wurde durch mehrstündige Inkubation in der gleichen Lösung, jedoch ohne HMM, bei mehrfachem Wechsel des Mediums, entfernt. Anschließend wurden die Zellen wie üblich fixiert und eingebettet.

2.09. Herstellung von Mougeotia-Protoplasten

Für den Aktin-Nachweis mittels HMM erwies sich die Zellwand von Mougeotia als sehr störend. Sie wurde deshalb enzymatisch nach einer modifizierten Methode von MARCHANT und FOWKE (1977) entfernt.

Als Enzymlösung diente MXS, dem $0,3-0,4 \text{ mol l}^{-1}$ Mannit, $67 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ Phalloidin, 2 % (g/v) Cellulysin und 0,1 % (g/v) Macerace zugefügt war. Der pH-Wert wurde auf 5,5 eingestellt.

Die Algen wurden in kleinen Mengen bis zu 6 Stunden in dieser Lösung bei $23-27^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Die ersten Protoplasten traten nach 1-2 Stunden auf. Sie wurden nach ihrer Freisetzung in enzymfreies Medium überführt, um eine Zellschädigung zu vermeiden. Als Isoliermedium diente MXS mit einer Mannitkonzentration von $0,2-0,4 \text{ mol l}^{-1}$ und einem pH-Wert von 6,0. Die Protoplasten waren bei höheren Mannitkonzentrationen sehr stabil, während sie bei niedrigen Mannitkonzentrationen sehr leicht innerhalb weniger Minuten platzten.

2.10. Aktin-Identifizierung durch HMM-Dekorierung an gespreiteten Mougeotia-Protoplasten und Trennung des Aktin-HMM-Komplexes durch ATP (ATP-Kontrolle)

Die isolierten Protoplasten wurden mittels einer $20 \text{ } \mu\text{l}$ -Pipette auf Kupfernnetzchen gebracht, die 24-48 Stunden vor Gebrauch mit Formvar befilmt und in der Aufdampf-anlage E 306 von Edwards (Crawley) mit Kohle bedampft worden waren. Um ein Anheften der Protoplasten zu ermöglichen, war auf die Oberfläche der Netzchen ein Tropfen Poly-L-Ornithin-Lösung mit einer Konzentration von 1-5 mg/ml gegeben und der Überschuß abgesaugt worden.

Nachdem die Protoplasten an der Folie hafteten, wurden die Trägernetzchen mit MXS-Medium mit Zusatz von $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ ATP, 1 mmol l^{-1} MES und 0,1 % Triton X 100, pH 6,75 gespült, anschließend nochmals mit der gleichen Lösung, jedoch ohne Triton X 100. Bei einer zweiten Versuchsreihe wurde anstelle des MXS-Mediums folgende Lösung verwendet: Tris-Maleat-Puffer $0,02 \text{ mol l}^{-1}$,

MgCl_2 $0,005 \text{ mol l}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $67 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ Phalloidin mit bzw. ohne Zusatz von $0,1 \%$ (v/v) Triton (WOHLFARTH-BOTTERMANN und ISENBERG 1976).

Bei beiden Versuchsreihen wurde mit $0,5 \%$ iger (g/v), wäßriger Uranylacetatlösung kontrastiert. Die Netzchen wurden im Exsikkator aufbewahrt und innerhalb der nächsten 48 Stunden im Elektronenmikroskop betrachtet.

Weiterhin wurde folgende Methode ausprobiert:

Die Protoplasten wurden in ein Isoliermedium mit geringer Mannit-Konzentration überführt, so daß sie sich stark vergrößerten. Sie wurden auf Formvar-befilmte, mit Kohle und mit Poly-L-Ornithin behandelte Netzchen überführt und hafteten an der Folie. Aufgrund ihrer Größe platzten die Protoplasten sehr leicht. Geschah dies nicht spontan, so brachte eine leichte Erschütterung die Protoplasten zum Platzen. Mit Formvar-befilmten Trägernetzchen, die ebenfalls mit Kohle und Poly-L-Ornithin vorbehandelt waren, wurde die Tropfenoberfläche auf dem ersten Grid vorsichtig abgetupft. Beide Netzchen wurden mit Tris-Maleat-Puffer 5 mmol l^{-1} (pH 7), KCl $0,05 \text{ mol l}^{-1}$, MgCl_2 5 mmol l^{-1} , gespült und mit wäßriger Uranylacetatlösung kontrastiert. Die Anregung zu dieser Idee ergab das Spreiten von Cytoplasmatropfen von *Physarum polycephalum* (ISENBERG und WOHLFARTH-BOTTERMANN 1976).

Die Trägernetzchen wurden im Exsikkator aufbewahrt und innerhalb der nächsten 48 Stunden im Elektronenmikroskop ausgewertet.

HMM-Dekorierung

Zur Dekorierung mit HMM wurden die Proben-träger wie oben beschrieben gewaschen und dann 1-5 Minuten lang mit HMM (2 mg/ml) in Tris-Maleat-Puffer 5 mmol l^{-1} , pH 7,0 inkubiert. Anschließend wurden die Netzchen zur Entfernung von überschüssigem HMM kurz mit dem gleichen Tris-Maleat-Puffer, jedoch ohne HMM gespült und mit Uranylacetat kontrastiert.

ATP-Kontrolle

Zur ATP-Kontrolle wurden die Grids nach der HMM-Inkubation mit MES-Puffer $0,3 \text{ mmol l}^{-1}$ mit ATP 1 mmol l^{-1} , pH 6,8, gespült und anschließend mit Uranylacetat kontrastiert.

2.11. Statistische Auswertung

Die intrazelluläre Verteilung der Cytosomen und Mitochondrien während der Plastidenbewegung wurde mittels des χ^2 -Verfahrens (PÄTAU 1942, 1943) geprüft.

Nach Ablehnung der Nullhypothese wurden die jeweiligen Werte mit dem Wert zur Zeit $t = 0$ mittels Differenzenprüfung auf Signifikanz untersucht.

3. ERGEBNISSE

3.01. Vorversuche zur allgemeinen Zellmorphologie von Mougeotia und Abwägung geeigneter Fixierungsmethoden

In Vorversuchen wurden Fixierungsmethoden entwickelt, die bei Mougeotia eine gute zelluläre Strukturhaltung gewährleisten sollten. Dabei ergaben sich einige neue Einzelheiten zur allgemeinen Zellmorphologie von Mougeotia; z.T. wurden alte Beobachtungen bestätigt.

Deshalb soll im folgenden der Aufbau der Mougeotia-Zelle erläutert werden. Daran anschließend werden die Veränderungen von Zellstrukturen in Abhängigkeit von der Fixierungsmethodik besprochen.

Mougeotia ist eine fädige Grünalge mit zylindrischer Zellform. Der Durchmesser der einzelnen Zelle ist mit 30 μm relativ konstant, während die Zelllänge vom Zellalter und den Kulturbedingungen abhängt; es wurden Extremwerte von 67 μm bzw. 298 μm gemessen.

Jede Zelle besitzt einen großen bandförmigen Chloroplasten, der in seiner flächigen Ausdehnung den Durchmesser und die Höhe des Zellzylinder voll beansprucht. Der Chloroplast unterteilt die Zellvakuole in zwei Teilvakuolen, die an den Plastidenkanten teilweise miteinander in Verbindung stehen (siehe Abb. 1).

Das Cytoplasma umgibt den Chloroplasten beidseits und wird in dieser Arbeit als "plastidäres Cytoplasma" bezeichnet. Das sogenannte "corticale Cytoplasma" liegt infolge des osmotischen Druckes der Zellwand eng an. Dieses wandständige Cytoplasma ist 0,05 - 0,1 μm dick. Das plastidäre Cytoplasma dagegen variiert stark in seiner Dicke (0,05 - 4 μm). Der für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wichtige Cytoplasmabereich liegt in der Nähe der Plastidenkante; er wird als Übergangsbereich bezeichnet, da hier plastidäres und corticales Cytoplasma ineinander übergehen.

Abb. 1:

Querschnitt durch eine Mougeotia-Zelle.

Der Chloroplast (Chl) enthält ein Pyrenoid (P) mit Stärkespangen (St). Im plastidären Cytoplasma (pl C) befindet sich ein Dictyosom (D) und Endoplasmatisches Reticulum (ER). Der Plastid teilt den Zellsaftraum in zwei Teilmembranen (Vak). Der Zellwand (W) liegt das corticale Cytoplasma (co C) an.

Abb. 2:

Längsschnitt durch eine Mougeotia-Zelle.

Der Chloroplast (Chl) enthält ein Pyrenoid (P) mit Stärkespangen (St). Im plastidären Cytoplasma (pl C) befindet sich der Kern (K) mit einem osmiophilen Nukleolus (Nk). Osmiophile Cytosomen (Cyt) liegen im corticalen (co C) und plastidären Cytoplasma. Mikrofilamentbündel (Fil) treten ebenfalls in beiden Cytoplasmabereichen auf. Man beachte die Kontrastveränderung der Zellwand.



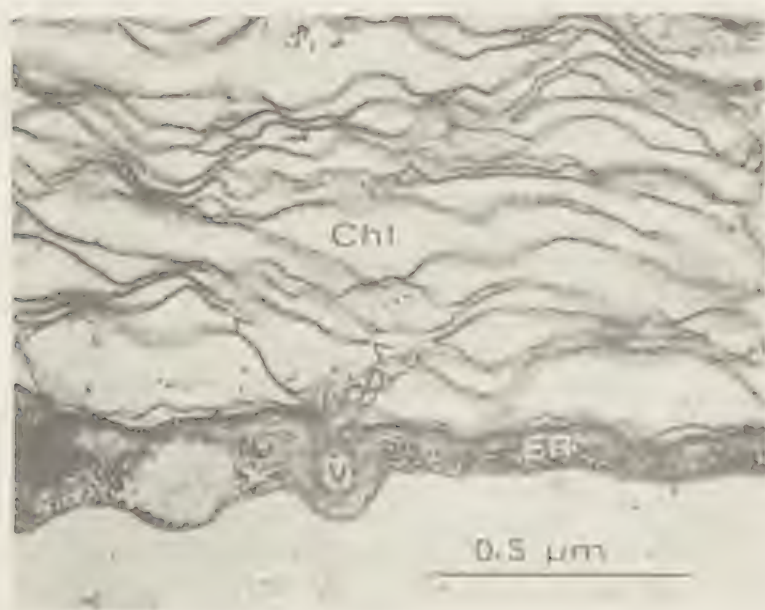
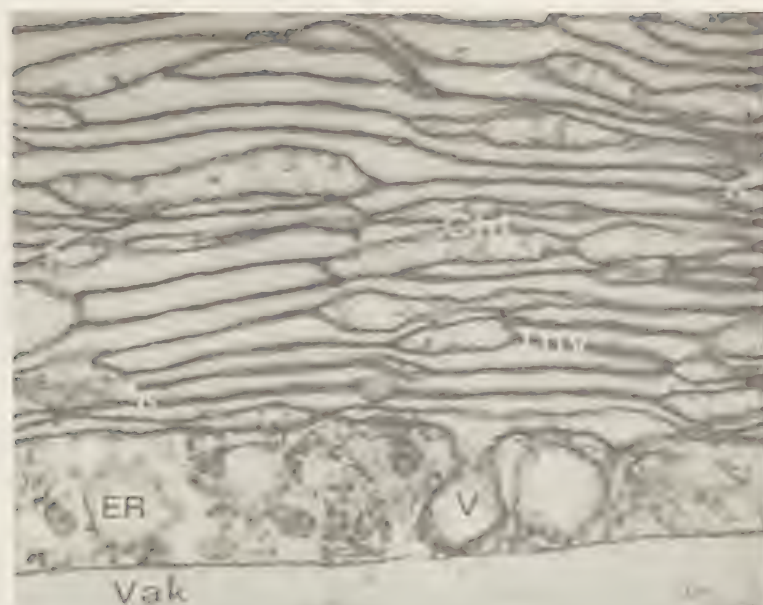


Abb. 3 und Abb. 4:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Man erkennt das Stroma des Plastiden (Chl) und Einfaltungen (siehe Pfeile) unvollständiger Thylakoide (Thy). Auf beiden Abbildungen haben cytoplasmatische Vesikel (V) Kontakt mit der Plastidenmembran. Das ER tritt in Form runder Vesikel (Abb. 3) oder in Form langer Schläuche (Abb. 4) auf.

Weiteres Detail: Zellvakuole (Vak).



Der Chloroplast füllt in seiner Längsachse die Zelle aus. Der Kontakt zur Querwand kann sehr eng sein, jedoch ist der Plastid unter bestimmten Kultur- und Lichtbedingungen von der Querwand abgehoben (siehe auch SCHORER-MÖRTEL 1972a,b).

Die Kante des Chloroplasten ist nur selten so gerade wie häufig in Schemazeichnungen dargestellt. Sie kann sich in vielfältiger Weise ausbuchten (siehe Seite 74), wobei maximal drei Lappen beobachtet werden.

Der Chloroplast ist durchgehend von Thylakoid-Lamellen durchzogen, wie es für viele Algen typisch ist. Allerdings findet man Einfaltungen unvollständiger Lamellen (siehe Abb. 3 und 4), die von KAJA (1966) als Teilungsstadien von Thylakoiden interpretiert werden. Anhäufungen solcher Thylakoidstapel, die von FOOS (1971) als Grana bezeichnet wurden, konnten in Übereinstimmung mit PUISEUX-DAO und LEVAIN (1963) bei dieser Untersuchung nicht gezeigt werden.

An Mougeotia-Chloroplasten kann man bereits im lichtmikroskopischen Bild durchschnittlich 5 - 9 Pyrenoide entdecken. Das Stroma der Pyrenoide besteht, wie bereits von PUISEUX-DAO und LEVAIN (1963) und FOOS (1971) beschrieben, aus einer dichten, granulären Substanz. Da sie stark osmophil ist, stellt sie sich nach Fixierung mit Osmiumtetroxid tief schwarz dar (Abb. 5 und 7). Bei einer alleinigen Glutaraldehydfixierung, bei der OsO_4 lediglich zum Nachfixieren verwendet wurde, erscheint das Pyrenoid grau; eine granuläre Struktur ist erkennbar (siehe Abb. 6). Das Stroma wird von 30 - 40 Thylakoiden vollständig durchzogen. Die das Pyrenoid umgebende Stärke stellt sich bei den üblichen Fixierungen als reinweiße Substanz dar, die aber auch auf einigen Fotos in Grautönen changierend erscheint. Daß es sich dabei um Stärke handelt, konnte mit der Methode von THIÉRY nachgewiesen werden. Abb. 6 zeigt einen Schnitt durch eine Mougeotia-Zelle, die mit Glutaraldehyd und anschließend mit OsO_4 fixiert wurde. Der Dünnschnitt wurde mit Perjodsäure, Thiosemicarbazid und

Abb. 5, 6 und 7:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Thylakoidmembranen (Thy) durchziehen das osmiophile Stroma (Sr) des Pyrenoids (P) vollständig. Stärkespangen (St) umgeben das Pyrenoid.

Bei Behandlung nach der THIÉRY-Methode (Abb. 6) erscheint die Stärke (St) tiefschwarz.

Abb. 7 zeigt zwei dicht nebeneinander liegende Pyrenoide mit einer gemeinsamen Stärkespange.

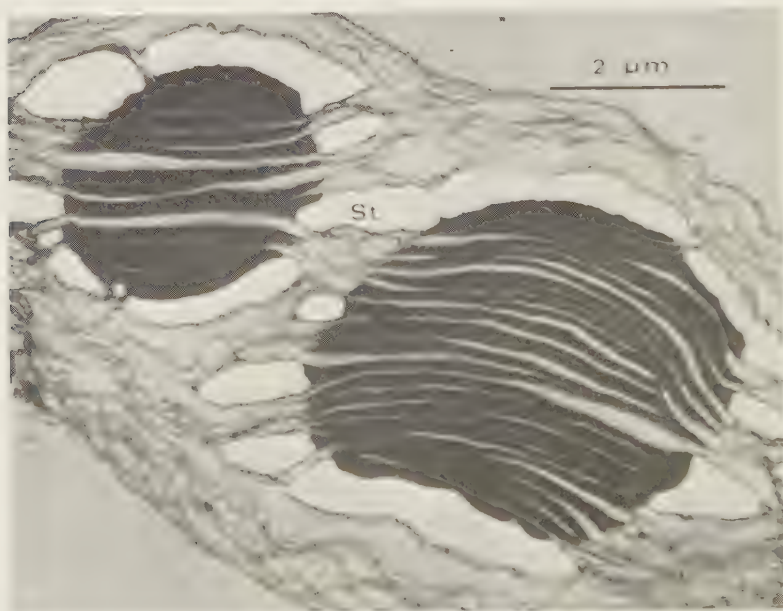
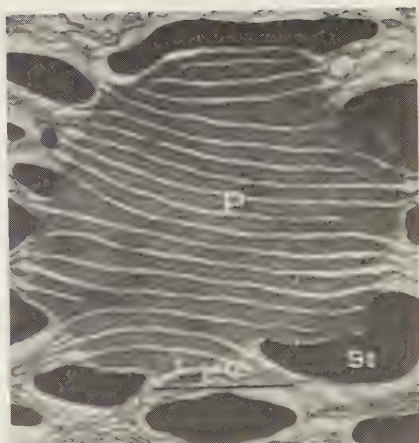
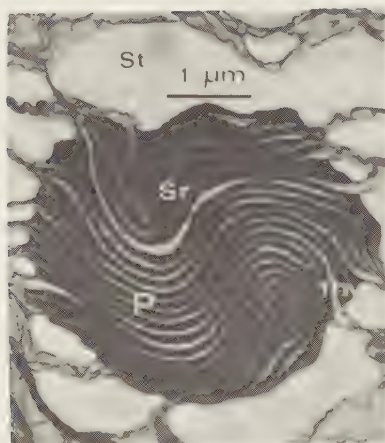


Abb. 8 und Abb. 9:

Ausschnittsvergrößerungen aus Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Im plastidären Cytoplasma (pl C) liegen Mitochondrien (Mit).
Fingerförmige Einstülpungen der inneren Membran sind an
einigen Stellen zu erkennen.

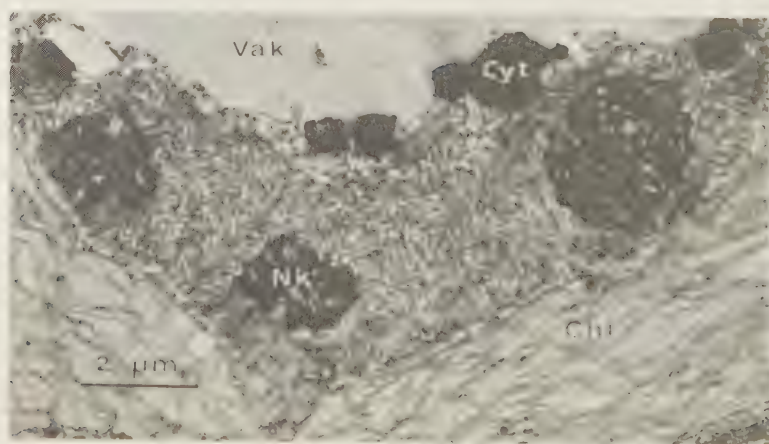
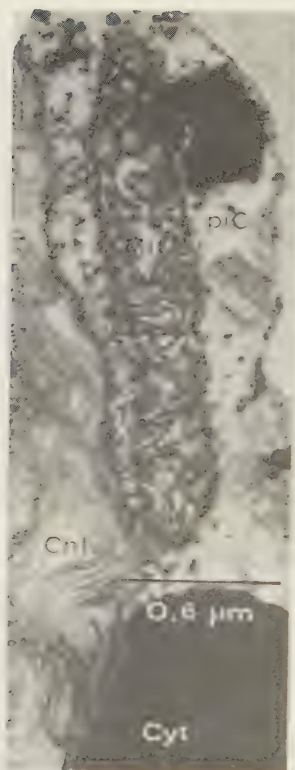
Weitere Details: Chloroplast (Chl) und Cytosomen (Cyt).

Abb. 10:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Im plastidären Cytoplasma liegt der Kern (K), der in dieser
Zelle drei Nukleoli (Nk) besitzt.

Weitere Details: Mitochondrien (Mit), Cytosomen (Cyt),
Vakuole (Vak) und Chloroplast (Chl).



Silberproteinat behandelt. Stärke erscheint nun tief schwarz. Pyrenoide vermehren sich durch Teilung, indem die Grundsubstanz in zwei Bereiche abgeschnürt wird und dann unter leichter Verdrillung auseinandergezogen wird, wobei jeder Bereich seine Stärkespangen behält (siehe PUISEUX-DAO und LEVAIN 1963). Abb. 7 zeigt zwei Pyrenoide nach erfolgter Trennung. Man erkennt, daß eine Stärkespange noch zu beiden Pyrenoiden gehört.

Die Mitochondrien von Mougeotia liegen bevorzugt im plastidären Cytoplasma. Sie sind leicht oval mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,4 μm bzw. 0,5-1 μm . Einzelne Exemplare können extrem lang werden (siehe Abb. 9). Die Mougeotia-Mitochondrien gehören zum sacculären Typ. Die mitochondriale Doppelmembran ist besonders gut auf Abb. 28 und Abb. 29 zu erkennen. Die Matrix ist granulär und wird je nach Fixierungsbedingungen mehr oder weniger dicht erhalten oder auch extrahiert.

Der Zellkern von Mougeotia befindet sich stets im plastidären Cytoplasma, ungefähr in der Mitte der Zellängsachse. Der Zellkern ist sehr verformbar und liegt deshalb auch bei Krümmungen des Plastiden diesem eng an. Das Karyoplasma wird von einer Doppelmembran umschlossen, ist feinkörnig und stärker kontrastierbar als das Cytoplasma. Auch unter Fixierungsbedingungen, die zu einer Extraktion des Grundplasmas führen, ist das Karyoplasma noch relativ gut erhalten.

Der Nukleolus ist, wie von FOOS beschrieben, netzförmig. Er wird von keiner Membran umgeben und ist osmiophil. Seine durchschnittliche Größe liegt bei etwa 3,5 μm . Abb. 10 zeigt die seltene Beobachtung von 3 Nukleoli innerhalb eines Kernes.

Ebenso wie der Zellkern liegen die Dictyosomen des Golgi-Apparates im plastidären Cytoplasma; hier wiederum in den kantennahen Bezirken. An 29 zufällig ausgewählten Fotos unterschiedlich fixierter Algen wurde die Lage von insgesamt 37 Dictyosomen untersucht. Es wurde im Zell-

Abb. 11:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Abb. 11 zeigt ein Dictyosom im plastidären Cytoplasma. Schmale Zisternenstapel (Z) schnüren am Rande Vesikel (V) ab. Zwischen Chloroplast (Chl) und Dictyosom liegen ER-Vesikel.

Abb. 12:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Nach Glycerinierung ist die Struktur der Dictyosomen zerstört. Man erkennt an einigen Stellen (siehe Pfeil) immer noch Verbindungen der Zisternen (Z) untereinander.

Abb. 13:

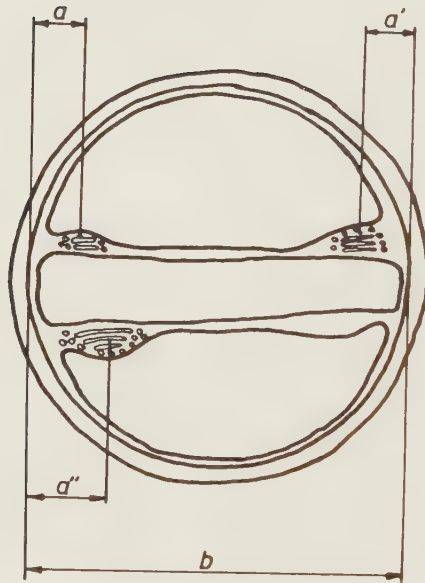
Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Zwei Dictyosomen liegen dicht nebeneinander im plastidären Cytoplasma.



Schemazeichnung

zur Bestimmung der Lage der Dictyosomen



$$x = \frac{a}{b} ; \quad \text{bzw.} \quad \frac{a'}{b} ; \quad \text{und} \quad \frac{a''}{b}$$

querschnitt der Abstand vom Mittelpunkt des Dictyosoms zum inneren Zellwandrand ausgemessen ($\hat{=}$ a) und auf den inneren Zelldurchmesser ($\hat{=}$ b) bezogen (siehe Skizze). Es ergab sich ein Durchschnittswert von 0,18 mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,06 und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 0,01.

Das einzelne Dictyosom zeigt einen polaren Aufbau (siehe Abb. 12). Das den Plastiden umgebende ER speist anscheinend bei Mougeotia den Golgi-Apparat; so liegt die konvexe Aufnahmeseite plastidennah, die konkave Abgabeseite dagegen vakuolennah. Auf Abb. 11 kann man die Abschnürung von Golgi-Vesikeln am Rande der Membranstapel gut erkennen. Eine Vernetzung der Membranen zeigt Abb. 12. Die Zelle wurde - für eine andere Versuchsreihe - einige Tage glyceriniert, so daß leichtlösliche Zellbestandteile extrahiert wurden; die Zellstruktur hat erheblich gelitten. Dennoch erkennt man Verbindungen der Membranen untereinander (siehe Pfeil). Dies könnte ein Hinweis sein, daß im Mougeotia-Dictyosom ein Austausch von Inhaltsstoffen und Membranen stattfindet (siehe dagegen ROBINSON 1980). Abb. 13 zeigt zwei nebeneinanderliegende Dictyosomen. Da dies nur einmal gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, daß die Vergesellschaftung durch Querteilung eines Golgi-Apparates zustande gekommen sein könnte.

Gelegentlich treten Anhäufungen von Vesikeln im Übergangsbereich des Cytoplasmas auf. Sie liegen ausnahmslos in dem kleinen Bezirk zwischen Dictyosom und Zellwand. Es könnte sich um Vesikel mit Transportfunktion handeln, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt wurden, oder aber um Artefakte.

Das Endoplasmatische Reticulum liegt dem Mougeotia-Plastiden beidseits eng an. Mit wenigen Ausnahmen findet man nur glattes ER (siehe dagegen FOOS 1971). Das wandständige Cytoplasma ist frei von ER; lediglich in dem der Kante nahgelegenen corticalen Cytoplasmabereich treten gelegentlich Vesikel auf, die eventuell zum ER gehören. Über den Gehalt der ER-Vesikel an Ionen, speziell Calcium, ist bei Mougeotia nichts bekannt.

Abb. 14 und Abb. 15:

Ausschnittsvergrößerungen aus Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Direkt an der Chloroplastenkante (Chl) - in unmittelbarer Nähe der Zellwand (W) - liegt eine Anhäufung von Vesikeln (V) unterschiedlicher Größe.

Weitere Details: Mitochondrien (Mit), Cytosomen (Cyt) und Ribosomen (R) im corticalen (co C) und plastidären Cytoplasma (pl C).



Die Zellwand von Mougeotia wurde bereits ausführlich von FOOS 1971 beschrieben. Der Protoplast ist von einer einschichtigen Zellwand umgeben. Im Bereich der Querwand bleiben die jeweils zellzugehörigen Wände durch einen elliptischen Spalt getrennt (siehe Abb. 16, 17 und 18). In diesem Spalt liegt eine pektinähnliche Substanz, die 1963 von PUISEUX-DAO und LEVAIN durch Färbung mit Rutheniumrot nachgewiesen wurde.

Die Querwand erscheint meist linsen- bis napfförmig. Die Struktur der Querwand erklärt auch, daß Mougeotia-Fäden bei mechanischer Beanspruchung sehr leicht in kürzere Fäden oder in Einzelzellen zerfallen.

Gelegentlich findet man kleine Bläschen, die zwischen dem wandständigen Plasmaschlauch und der Zellwand liegen (siehe Abb. 19-22). In Abb. 22 liegen diese Vesikel in dem Winkel, der von Quer- und Längswand gebildet wird. Wahrscheinlich werden die Vesikel vom corticalen Cytoplasma abgegeben.

Die Mougeotia-Zelle besitzt viele Cytosomen, die in der Literatur häufig als Physoden oder Gerbstoffbläschen bezeichnet werden. Es handelt sich um ovale bis längliche Vesikel mit einem Durchmesser von knapp 1 μm , deren Form und Größe sehr schwanken. Sie sind stark osmiophil, so daß sie bei Fixierungen mit OsO_4 schwarz erscheinen, z.T. erkennt man eine Granulierung der Matrix. Die Cytosomen enthalten hochkonzentriert schwerlösliches Calcium (WAGNER und ROSSBACHER 1980).

Im gesamten Cytoplasma treten Cytosomen auf, jedoch bevorzugt in der Nähe der Kante. "Die Chloroplastenkante scheint ein von den Gerbstoffbläschen bevorzugter Ort zu sein, da sie immer von einer Reihe dieser Einschlüsse eingesäumt ist, selbst wenn die Zelle sehr arm an Gerbstoffbläschen ist" (FOOS 1966).

Cytosomen werden in vielen Zellsystemen vom ER oder den Golgi-Vesikeln gebildet (BLÜM et al. 1976). Weder in den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von

Abb. 16, 17 und 18:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Längsschnitte).

Es ist die napfförmige Querwand (Qw) angeschnitten. Die Längswände (Lw) setzen sich in der Querwand fort, wobei sie zwischen sich einen Raum mit locker fibrillösem Material freilassen (siehe Stern). Am Übergang von Längs- und Querwand liegt ein Keil homogeneren Materials (siehe Pfeil).

Auf Abb. 17 ist die außenliegende Schleimschicht (S) gut zu erkennen. Der Protoplast hat sich von den Wänden zurückgezogen.

Abb. 19, 20 und 21:

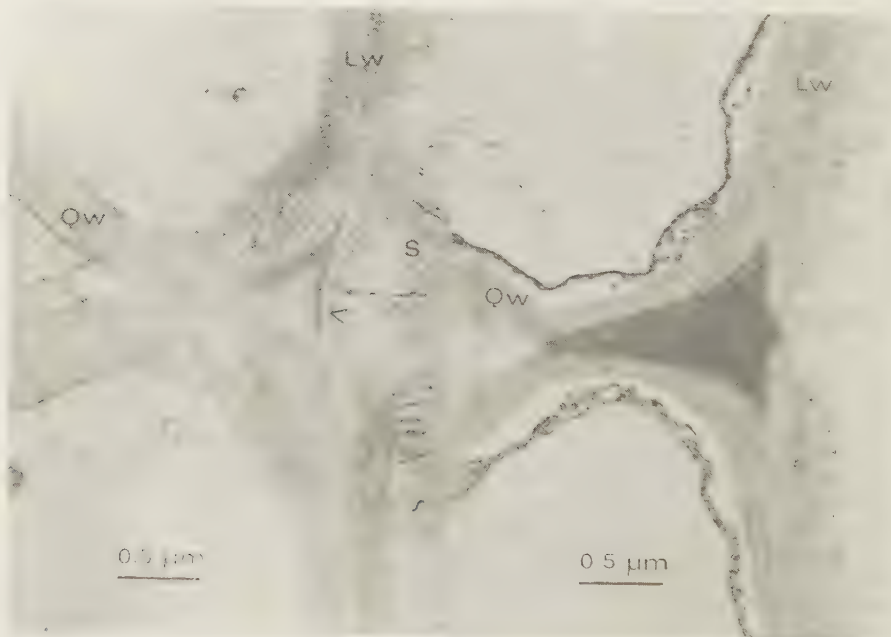
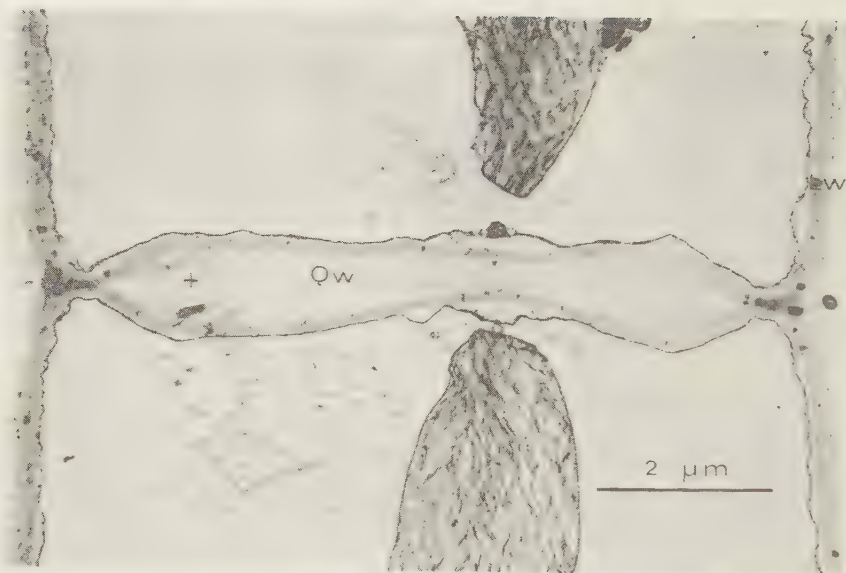
Ausschnittsvergrößerung von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

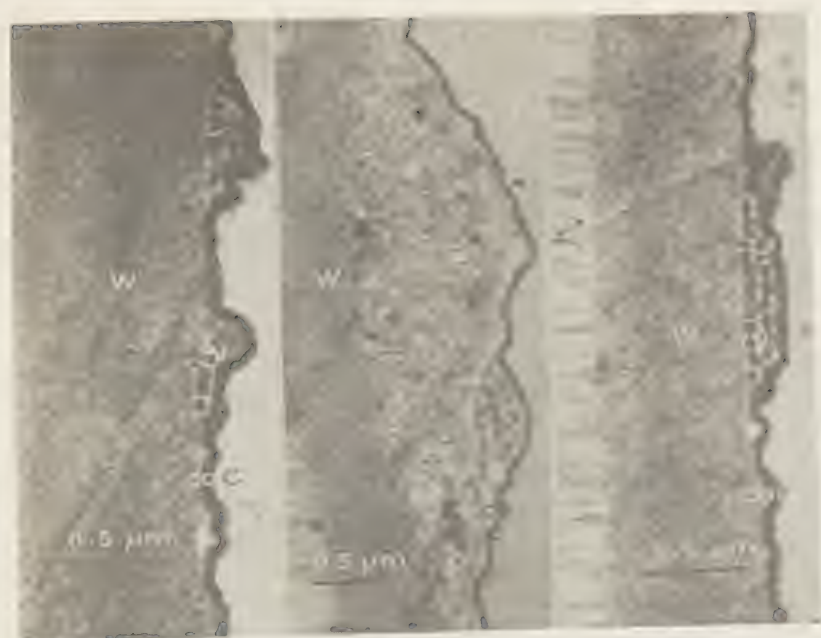
Membranöse Vesikel (V) liegen zwischen Zellwand (W) und corticalem Cytoplasmaschlauch (co C).

Abb. 22:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Längsschnitt).

Membranöse Vesikel (V) liegen zwischen corticalem Cytoplasma (co C), Quer- (Qw) und Längswand (Lw).





PUISEUX-DAO und LEVAIN (1963) und FOOS (1971), noch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, woher die osmiophilen Cytosomen stammen.

Neben den schwarzen Cytosomen treten auch einheitlich grau gefärbte Vesikel auf. Sie sind im allgemeinen etwas größer als die Cytosomen und kreisrund. Über ihre Funktion und ihren Inhalt ist nichts bekannt.

Um zu verhindern, daß fixierungsbedingte Artefakte als zellphysiologisches Ergebnis interpretiert werden, ist es vorteilhaft, ein- und dieselbe Zellstruktur bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden zu vergleichen.

Für Mougeotia erwies es sich als äußerst schwierig geeignete Fixierungen zu finden, da diese Algenzelle sehr empfindlich auf Eingriffe chemischer oder physikalischer Art reagiert. Der dicke Schleimmantel behindert schnelles Eindringen von Fixierungsmitteln und damit eine möglichst artefaktfreie Fixierung. Das für meine Fragestellung interessante Cytoplasma liegt nur als dünne Schicht entlang der Zellwand und des Plastiden und löst sich häufig bei der Fixierung von der Zellwand ab. Es wurde deshalb mit verschiedenen chemischen Fixierungsmethoden experimentiert; physikalische Fixierungsvorgänge wie z.B. Kryofixierung wurden nicht eingesetzt.

Als Fixierungs-Puffer diente der in der Elektronenmikroskopie übliche Cacodylat-, Collidin- und Trismaleat-Puffer. Aber auch Lösungen wie F-Puffer von JACOBSON (1976) und MXS-Lösung wurden verwendet. Als Fixans diente Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, häufig auch kombiniert als Simultanfixierung, sowie Acrolein.

Als sehr fixierungskonstant erweisen sich die Zellwand, das Pyrenoid, sowie der Kern mit Nukleolus. Diese Zellbestandteile haben bei allen verwendeten Fixierungen das gleiche Aussehen. Dagegen variieren andere Zellbestandteile sehr stark.

Abb. 23:

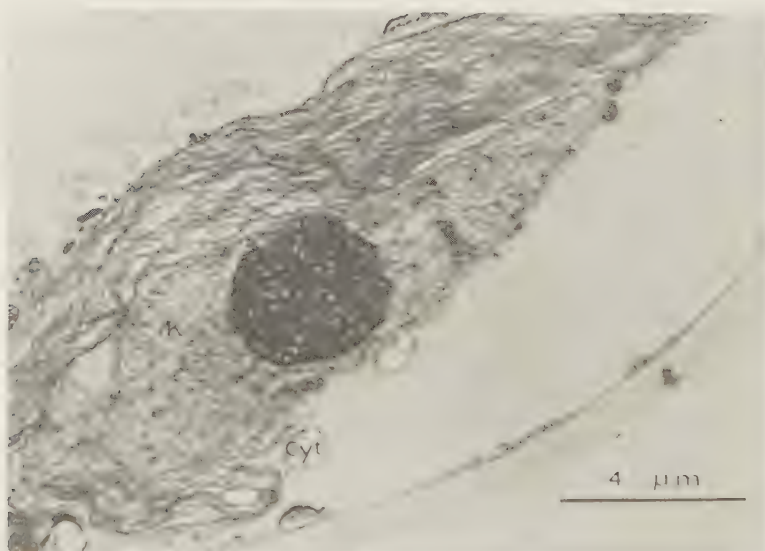
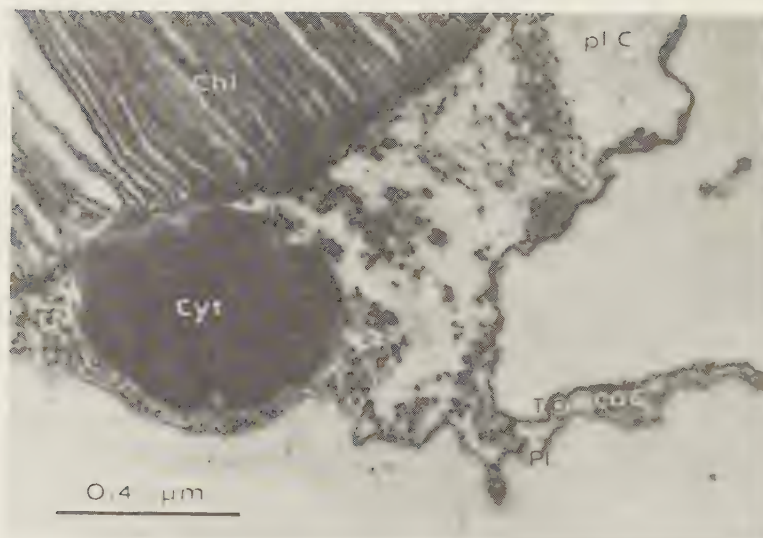
Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

An der Plastidenkante (Chl) - im Übergangsbereich (Ü) zwischen corticalem (co C) und plastidärem Cytoplasma (pl C) - liegt ein membranöses, osmiophiles Cytosom (Cyt). Das Plasmalemma (Pl), die Cytosomenmembran und teilweise auch der Tonoplast (Tp) werden als Doppel-
linie dargestellt.

Abb. 24:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Im plastidären und corticalen Cytoplasma liegen Cytosomen, deren Matrix sich wegen der OsO_4 -freien Vorfixierung weiß darstellt. Die Membran der Cytosomen ist gut zu erkennen. Der Kern (K) mit seiner Doppelmembran (siehe +) liegt im plastidären Cytoplasma.



Die Membranen werden bei allen verwendeten Fixierungen gut dargestellt, unter der Voraussetzung, daß sie im Schnitt tatsächlich senkrecht getroffen werden. Eine Fixierlösung, bestehend aus MXS-Lösung mit 1 % (g/v) OsO_4 , 0,5 % (g/v) Glutaraldehyd und 1 % (g/v) Tannin, führte zur besten Strukturhaltung der Membranen. Wie auf Abb. 23 zu sehen, sind Plasmalemma, Tonoplast und Cytosomenmembran mit einem Zwischenspalt dargestellt. Es fällt auf, daß das Plasmalemma weniger Kontrast zeigt als der Tonoplast. Innerhalb des Plasmalemmas ist die zellauswärts gerichtete hydrophile Schicht weniger kontrastiert als die innere, dem Cytoplasma zugewandte hydrophile Schicht. Dies läßt auf einen asymmetrischen Aufbau der Plasmalemmamembran schließen.

Cytosomen unterscheiden sich, je nachdem ob simultan mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert wurde oder mit Glutaraldehyd allein. Bei der letztgenannten Methode wird OsO_4 nur während der Nachfixierung eingesetzt und wirkt auf eine bereits mit Glutaraldehyd vorfixierte Zelle. Unter diesen Bedingungen kann die Matrix der Cytosomen offensichtlich kein oder nur wenig OsO_4 binden und bleibt weiß, z.T. mit kleinen schwarzen Flecken. Dagegen bindet die die Cytosomen umgebende Membran wie üblich OsO_4 und erscheint deshalb dunkel (siehe Abb. 24).

Wird dagegen bereits bei der Vorfixierung OsO_4 eingesetzt, so ist die Matrix der Cytosomen meist tief-schwarz; hierbei können innerhalb einer Fixierung, ja sogar innerhalb einer Zelle große Unterschiede auftreten.

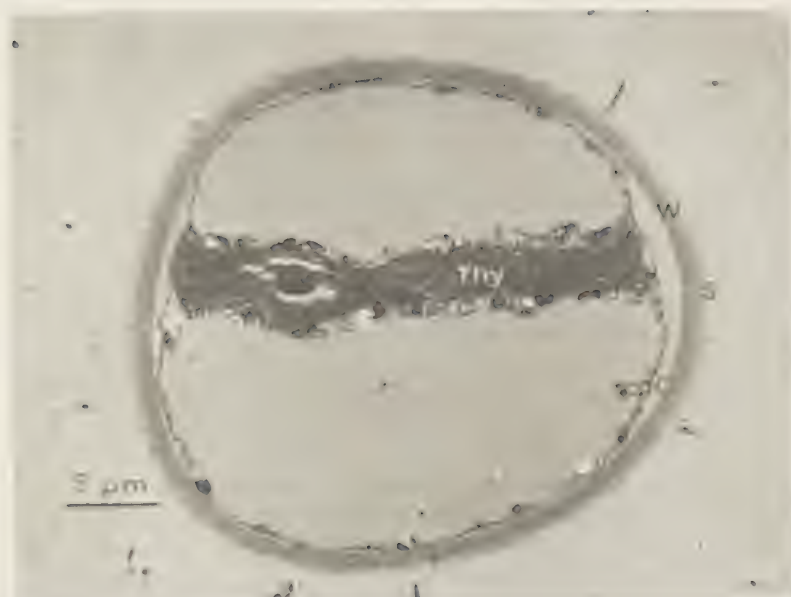
Solche unterschiedliche Strukturdarstellung bei ein- und derselben Fixierungsmethode tritt noch bei anderen Zellbestandteilen auf. Die Zellwand z.B. zeigt gelegentlich eine Kontrastumkehr von hell nach dunkel. Die Stärke, die sich meist weiß darstellt, erscheint manchmal in Grautönen changierend.

Abb. 25 und Abb. 26:

Querschnitte zweier identisch fixierter Mougeotia-Zellen.

In Abb. 25 kann man die Thylakoide (Thy) des Plastiden gut erkennen. In Abb. 26 dagegen liegen die Thylakoide so eng, daß sie auf diesem Foto optisch nicht mehr aufgelöst werden können.

Weitere Details: Zellwand (W) mit Schleimschicht (S); corticales Cytoplasma (co C), das sich teilweise von der Zellwand abgelöst hat; plastidäres Cytoplasma (pl C) mit Cytosomen (Cyt) und Mitochondrien (Mit).



Ursprünglich wurde in dieser Arbeit das enge Zusammenliegen der Thylakoide als Maß der Fixierungsgüte gewertet. Es zeigte sich jedoch, daß auch bei ein- und derselben Fixierung Zellen mit aufgeblähten Chloroplasten und Zellen mit schmalen Chloroplasten auftreten können. Abb. 25 und Abb. 26 zeigen zwei identisch fixierte Zellen, die auf einem Schnitt liegen. In Abb. 25 erkennt man deutlich die einzelnen Thylakoide, während sie auf Abb. 26 so dicht liegen, daß sie mit dem Auge nicht mehr aufgelöst werden können.

Deshalb kann man beim Auftreten von geblähten Thylakoiden nicht auf einen Fixierungsartefakt schließen; es könnte sich auch um einen physiologisch bedingten Organisationszustand handeln.

Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich beim Endoplasmatischen Reticulum. Das ER liegt bei Mougeotia z.T. in Form langer, schmaler Zisternen vor, die von einer einfachen Membran umgeben sind. Dies ist z.B. auf Abb. 27 und 28 gut zu erkennen. Es handelt sich hier um zwei unterschiedliche Fixierungen. Bei vielen Fixierungen findet man jedoch auch Zellen, deren Endoplasmatisches Reticulum aus kleinen aufgeblähten, fast kreisrunden Vesikeln mit einem Durchmesser zwischen 100 und 300 nm besteht (siehe Abb. 29). Liegt das ER als kanalartiges Netz vor, so kann es im Anschnitt, je nach Schnittrichtung, in Form runder Vesikel oder langer Schläuche angeschnitten werden.

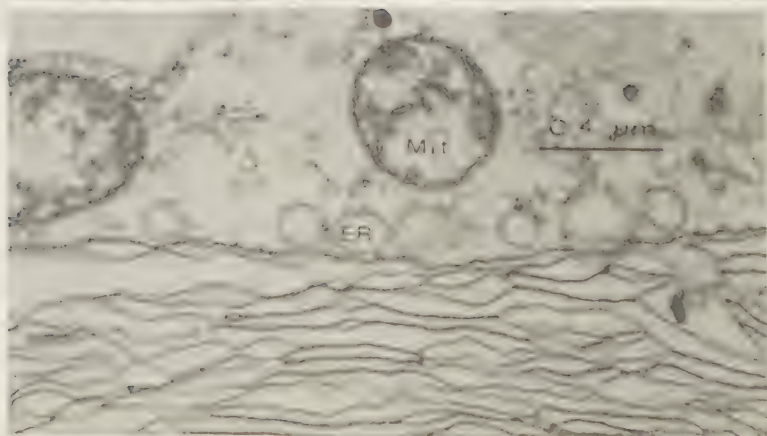
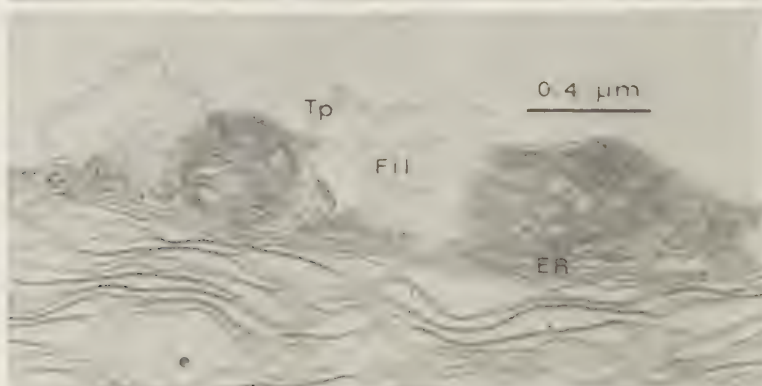
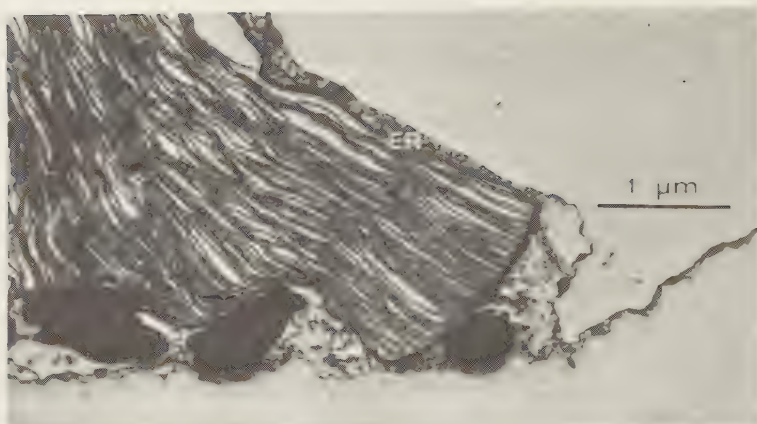
Andererseits kann es sich beim Auftreten runder Vesikel jedoch auch um einen unterschiedlichen physiologischen Zustand handeln, in dem sich die Zelle im Augenblick der Fixierung befand. Es ist bekannt, daß das ER Transport- und Produktionsfunktion ausübt. Ein Anschwellen des ER kann auch Zeichen einer Funktionssteigerung sein. Jedoch könnte es sich auch um einen durch das hypotonische Fixierungsmedium bedingten Artefakt handeln, da bei einigen Fixierungsmethoden das ER ausschließlich in Form runder Vesikel angeschnitten wurde. Darauf deutet auch Abb. 29, da hier nicht nur das ER, sondern auch die Mitochondrien

Abb. 27, 28 und 29:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Auf allen drei Abbildungen erkennt man Endoplasmatisches Reticulum. In Abb. 27 und 28 stellt sich das ER in Form langer Kanäle, in Abb. 29 dagegen in Form runder Vesikel dar.

Weitere Details: Filamentbündel (Fil), die sich vom Tonoplasten (Tp) gelöst haben; Mitochondrien (Mit) mit Doppelmembran und dichter (Abb. 28) bzw. optisch leerer (Abb. 29) Matrix.



stark angeschwollen sind. Mitochondrien gelten allgemein in der Elektronenmikroskopie als extrem empfindlich für hyper- oder hypotonische Fixierlösungen.

Durch den Fixierungs- und Einbettungsvorgang wird ein großer Anteil der cytoplasmatischen Grundsubstanz extrahiert, dies gilt ganz besonders für Mikrotubuli und Mikrofilamente. Im Extremfall geht dies soweit, daß das Cytoplasma völlig leer ist. Angestrebt wird eine Fixierung, bei der - neben guter Strukturhaltung aller anderen Zellbestandteile - das Cytoplasma dicht und stark mit Ribosomen besetzt erscheint.

Für eine solche lebensnahe Darstellung ist sowohl der verwendete Puffer als auch das Fixans von Bedeutung. Cacodylat- und Collidinpuffer ergeben im Vergleich zu Tris-Puffer und MXS-Lösung das Bild einer dichten, stark mit Ribosomen besetzten cytoplasmatischen Matrix, in der auch noch neben Ribosomen flockige und granuläre Strukturen zu erkennen sind. Als Beispiel kann hier Abb. 9 dienen.

Man erkennt auf Abb. 9, daß unter diesen Fixierungsbedingungen die Matrix relativ gut erhalten ist, wenn auch die Ribosomen nur mäßig dicht liegen. Mikrofilamente bleiben bei dieser Simultanfixierung mit Osmiumtetroxid und Glutaraldehyd und Cacodylatpufferebenfalls erhalten.

Collidin-Puffer wirkt noch stärker vernetzend und ist damit für die strukturelle Darstellung der cytoplasmatischen Matrix geeignet (siehe Abb. 30). Die Ribosomen liegen dicht gepackt in einer Grundmatrix. Selbst das Stroma innerhalb des Plastiden ist dichter als üblich. Wegen seiner größeren Dichte ist das Cytoplasma besonders dunkel und kontrastreich. Filamentöse Strukturen heben sich kaum von der Matrix ab. Membranen werden nur durchschnittlich dargestellt und so empfindliche Strukturen wie das ER sind besonders schlecht zu erkennen.

Abb. 30:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Sowohl das plastidäre (pl C) und corticale (co C) Cytoplasma als auch der Übergangsbereich (Ü) sind dicht mit Ribosomen besetzt. Auch die Matrix der Mitochondrien (Mit) ist gut erhalten. Der Pfeil zeigt eine Strukturveränderung im Übergangsbereich, bei der es sich um ein schlecht fixiertes Filamentbündel handeln könnte.

Abb. 31 und Abb. 32:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Mikrotubuli (Mt) liegen nebeneinander im corticalen Cytoplasma.



Die Strukturhaltung kann auch durch die Wahl des Fixans beeinflusst werden.

Abb. 28 zeigt eine Fixierung, die Abb. 9 vergleichbar ist mit dem Unterschied, daß anstelle von OsO_4 Acrolein als Vorfixans eingesetzt wurde. Acrolein ist, wie seine Strukturformel bereits vermuten läßt, sehr reaktiv. Es zeigt eine hohe Spezifität für Proteine und reagiert schnell mit SH-Gruppen über seine Kohlenstoff-Doppelbindung. Auf diese Weise werden freie Aldehydgruppen ins Gewebe eingeführt, die weiter reagieren können, so daß es zu einer besonders starken Vernetzung kommt (HAYAT 1970). Tatsächlich erscheint das Cytoplasma auf Abb. 28 dichter. Selbst die intrazisternale Phase des ER wird als Struktur dargestellt. Mitochondrien heben sich in ihrem Kontrast nicht von der Matrix ab. An einer Stelle kann man den genauen Umriß des Mitochondriums nicht erkennen.

Trotz der Vorteile der oben aufgeführten Fixiermethoden wurde häufiger eine Simultanfixierung mit Osmiumtetroxid und Glutaraldehyd sowie MXS-Lösung oder Tris-Puffer eingesetzt. Denn diese Fixiermethode hat einige auffallende Vorteile. Während bei anderen Fixierungen sich der dünne corticale Cytoplasmaschlauch leicht von der Zellwand ablöst, bleibt er bei dieser Methode eng anliegen. Dies ist wahrscheinlich durch die niedrige Osmolarität der Fixierungslösung bedingt. Die Zellorganelle, ganz besonders der Plastid, sind gut erhalten. Das Cytoplasma dagegen ist schlecht fixiert. Entweder ist es zu kleinen Flocken verklumpt oder im Extremfall wie in Abb. 29 leer. Dies hat jedoch den Vorteil, daß Organelle im Cytoplasma-bereich sich stark vom Untergrund abheben und deshalb auch auf Übersichtsaufnahmen sehr klar und deutlich dargestellt werden. Wider Erwarten bleiben trotz der Extraktion cytoplasmatischen Materials (siehe PORTER und KALLMANN 1953) die Mikrofilamente gut erhalten. Dies ist insofern erstaunlich, als der pH-Wert der Fixierlösung 6,0 beträgt und mit OsO_4 fixiert wird, dessen negative

Wirkung auf Aktin bekannt ist. Zudem sind die Mikrofilamente leichter von Cytoplasma abzugrenzen und meist auch als fädige Strukturen, nicht als Netzwerk erhalten.

Die Mikrotubuli, die im Cytoplasma liegen, werden durch Simultanfixierung mit MXS und - in ganz besonderem Maße - durch Fixation mit ATP-haltigem Trispuffer (F-Puffer nach JACOBSON 1976) auf Eis dargestellt. Dies ist bemerkenswert, da bei anderen Objekten Mikrotubuli besser bei Fixation bei Zimmertemperatur erhalten bleiben. Bei Mougeotia umgeben die Mikrotubuli die Zelle faßreifenartig (siehe Abb. 31 und 32) und liegen häufig in Zweier- und Dreiergruppen, wie von FOOS (1970) beschrieben. Verknüpfungen zwischen den Mikrotubuli und der Plasmamembran konnten im Gegensatz zu MARCHANT und HINES (1979) nicht gefunden werden.

3.02. Mikrofilamente und ihre Darstellung bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden

Neben der Beschreibung der allgemeinen Morphologie der Mougeotia-Zelle und der Suche nach einer günstigen Fixierung, ist es ein Ziel meiner Arbeit, Aktin-ähnliche Mikrofilamente bei Mougeotia nachzuweisen. Diese Mikrofilamente sollen elektronenoptisch so gut dargestellt werden, daß Aussagen über ihre eventuelle räumliche und funktionelle Beziehung zum Chloroplasten gemacht werden können.

Obwohl bei allen verwendeten Fixierungsmethoden Mikrofilamente bei Mougeotia auftraten, ist ihr Aussehen extrem variabel. Es reicht von deutlich parallel ausgerichteten, langen und geraden Filamenten, die zu einer Fibrille gebündelt sind, über ein verschlungenes watteartiges Netzwerk bis zu griesähnlichen Strukturen. Im Extremfall ist das filamentöse Material total extrahiert, so daß im elektronenmikroskopischen Bild nur ein Leerraum im Cytoplasma zu sehen ist.

Die Ursachen für diese Variabilität sind vielfältig. Zum ersten ist für die Darstellung von gebündelten Filamenten die Schnittrichtung wichtig. Nur wenn solch eine Fibrille genau in der Längsrichtung getroffen wird, stellen sich die Filamente auch als lange Fäden dar. Bei Schräg- oder Querschnitten wird das Bild unübersichtlich; man erkennt bestenfalls eine filamentöse Struktur, obwohl die Fibrille als solche wahrscheinlich gut erhalten ist. Zum zweiten kann natürlich ein Filamentbündel während des Fixierungsvorganges zerstört werden. Es ist aus der Literatur bekannt, daß Osmiumtetroxid sich negativ auf die Strukturerhaltung von Aktinfilamenten auswirkt (siehe POLLARD und MAUPIN 1978), da es bei längerer Einwirkungszeit die Aktinfilamente in kurze Bruchstücke zerlegt. Diese werden besonders leicht extrahiert. Zum dritten ist es möglich, daß bereits in vivo ein Filament-Netzwerk vorliegt (siehe BRITZ 1979).

Bei Fixierungen mit Cacodylatpuffer im neutralen pH-Bereich werden die Filamente meist als Netzwerk dargestellt. In Abb. 33 diente als Fixans Glutaraldehyd zusammen mit Osmiumtetroxid. Wahrscheinlich wurde eine Fibrille schräg getroffen. Die Strukturhaltung ist sehr schlecht. Zu betonen ist die Lage der Mikrofilamente (Durchmesser 5,5 - 7 nm) im Übergangsbereich zwischen plastidärem und corticalem Cytoplasma in der Nähe der Plastidenkante.

Wird OsO_4 gegen Acrolein ausgetauscht, so findet man meist auch nur Filamentknäuel, die darüberhinaus häufig von einer optisch leeren Zone umgeben sind (Abb. 28). Es scheint, als sei filamentöses Material extrahiert worden oder aber es habe sich während der Präparation zusammengezogen. Mit derselben Fixierung kann man aber auch Filamentbündel sehen (Abb. 34); die einzelnen Filamente sind jedoch stark gewunden. Auch hier fällt ein leerer Raum zwischen Fibrille und umgebender Membran auf. Die Filamente liegen ebenfalls in der Nähe der Chloroplastenkante und zwar tangential zur Wand. Das einzelne Filament hat einen Durchmesser von 5,5 - 7 nm, liegt also in der für Aktin erforderlichen Größenordnung.

Zusammenfassend ergab sich folgendes Resultat: Fixierung mit Cacodylatpuffer im Neutralen erhält intrazelluläre Mikrofilamente bei *Mougeotia*, jedoch ist die Darstellung nicht optimal. Ersatz des OsO_4 durch Acrolein führt anscheinend zu einer besseren Erhaltung von Fibrillen; dies ist aber nicht statistisch abgeklärt. Das Cytoplasma ist bei Acrolein-Glutaraldehyd-Fixierung in Cacodylatpuffer recht gut erhalten.

Ein ebenfalls sehr dichtes Cytoplasma erhält man bei Verwendung von Collidinpuffer (pH 6,9) mit Glutaraldehyd und OsO_4 als Simultanfixans. Diese Fixierung ist für die Erhaltung aller Zellbestandteile mit Ausnahme der Filamente fast optimal. Die Filamente scheinen während der Präparation nahezu vollständig depolymerisiert zu werden, so daß sie im elektronenmikroskopischen

Abb. 33, 34 und 35:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

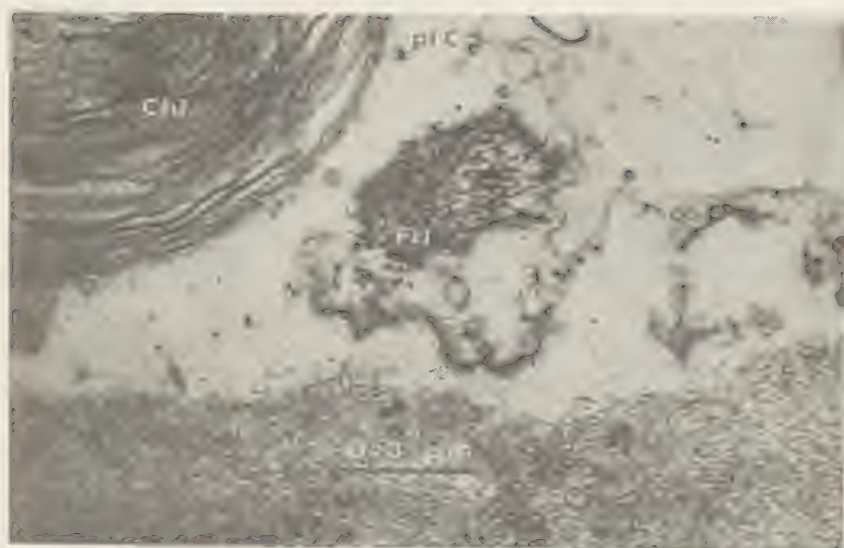
Fibrillenbündel (Fil) liegen an der Plastidenkante (Chl) im Übergangsbereich zwischen plastidärem (pl C) und corticalem Cytoplasma (co C).

Abb. 36:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Fibrillenbündel (Fil) befinden sich im corticalen Cytoplasma.

Weitere Details: Zellwand (W) und Vakuole (Vak).



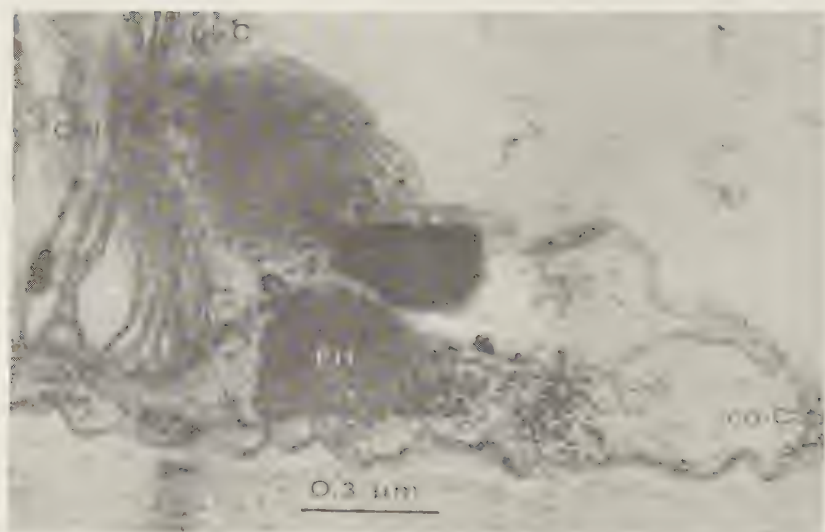


Bild nur noch als griesähnliche Struktur auftreten. In Abb. 35 erkennt man am Rande einer solchen Struktur einzelne kurze Filamente. Nur durch Lagevergleich solcher Strukturen mit anderen Fixierungen kann man diese als filamentöses Material identifizieren. Daß eine derartig aufgelöste Struktur während der Präparation nicht extrahiert wurde, erklärt sich durch die offensichtlich stark vernetzende Wirkung dieser Fixierlösung auf Proteine. Deshalb sind solche "Filamentbündel" bei dieser Fixierung recht häufig zu finden.

Als Fixierungslösung kann auch MXS-Puffer ($\text{pH} = 6,0$) verwendet werden. Von Vorteil ist, daß die Algen durch die vorherige Kultivierung an dieses Medium bereits adaptiert waren. Nachteilig erschien zunächst der leicht saure pH -Wert, denn üblicherweise werden Fixierungen mit neutralem bis schwach alkalischem pH -Wert für die intrazelluläre Darstellung von Aktinfilamenten verwendet (siehe z.B. WOHLFARTH-BOTTERMANN 1957; BETTEX-GALLAND und HUGHES 1973; MOORE et al. 1976; D'HAESE und HINSSEN 1978; HAUSER 1978; OBIKA et al. 1978; FRANKE et al. 1978). Es wurden jedoch mit dieser Fixierung insgesamt positive Ergebnisse erzielt.

Die Filamente sind kaum depolymerisiert und deshalb gut als Fibrille zu erkennen.

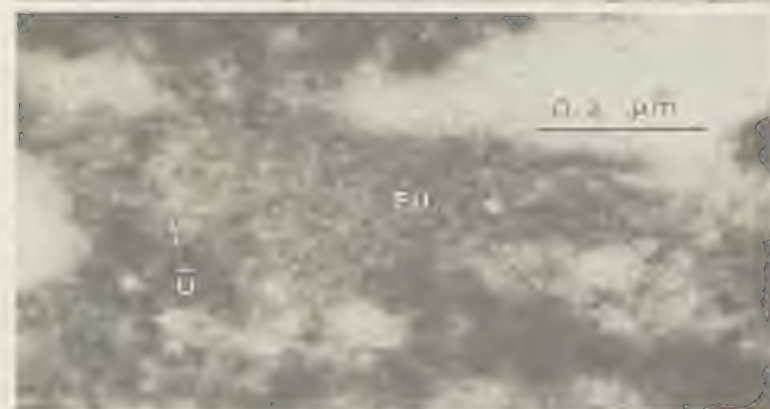
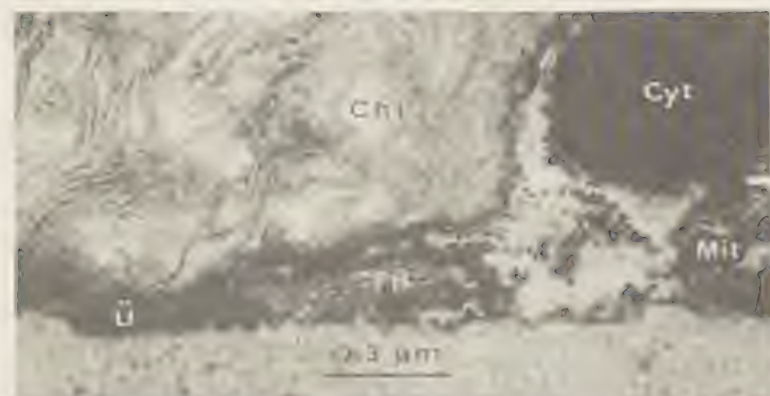
In Abb. 36 ist ein solches Filamentbündel im corticalen Cytoplasma zu sehen. Die bessere Strukturhaltung im Vergleich zu Abb. 35 ist offensichtlich. Es sind eindeutig einzelne Filamente mit ca. 7 nm Durchmesser zu sehen. An einer Stelle (Pfeil) wird das Bündel durch ribosomenhaltiges Cytoplasma abgegrenzt. Es fällt auf, daß das extrem dünne corticale Cytoplasma (ca. $0,05 \mu\text{m}$ Durchmesser) durch die Fibrille aufgeweitet wird. Dies kann auch durch Mitochondrien oder Cytosomen geschehen.

Es wurde versucht durch Zusatz bestimmter Chemikalien die Mikrofilamentdarstellung zu optimieren.

Abb. 37, 38 und 39:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Mikrofilamente (Fil) stellen sich nach verschiedenen Gerbstoff-haltigen Fixierungen unterschiedlich dar. Die Fibrillen liegen im corticalen Cytoplasma (co C), bzw. im Übergangsbereich (Ü). Das Plasmalemma (Pl) bildet sich als Doppellinie ab. Weitere Details: Chloroplast (Chl), Cytosom (Cyt) und Mitochondrium (Mit).



Es ist bekannt, daß Gerbsäuren die Strukturhaltung von Aktinfilamenten verbessern können (LaFOUNTAIN et al. 1977; POLLARD und MAUPIN 1978), wahrscheinlich indem sie sich dem Filament anlagern.

Es kamen Gallussäure und Tannin, ein relativ hochpolymeres Glykosid der Gallussäure zur Anwendung. Beide Substanzen führten nicht zu einer besseren Strukturhaltung der Mikrofilamente bei Mougeotia, unabhängig davon, ob sie während der Vor- oder Nachfixierung eingesetzt wurden.

Auch die Struktur der gesamten Zelle war verschlechtert. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß bei dieser Versuchsreihe die Algen in Agar vorkultiviert und fixiert wurden. Agar verhindert ein schnelles Eindringen der Fixiermittel und ist damit prinzipiell einer guten Strukturhaltung abträglich, so daß nicht bekannt ist, ob letztlich der Agar oder die Gerbstoffe für die schlechte Strukturhaltung verantwortlich sind. Abb. 37 zeigt ein corticales Filamentbündel, das mit 1 % Tannin, 1 % OsO_4 und 0,5 % Glutaraldehyd vorfixiert wurde. Auf Abb. 38 ist ein Filamentbündel im Übergangsbereich zwischen corticalem und plastidärem Cytoplasma nach einer ähnlichen Vorfixierung, jedoch ohne OsO_4 , dargestellt und in Abb. 39 nach Vorfixierung mit 1 % Gallussäure, 1 % OsO_4 und 0,5 % Glutaraldehyd. Die Gerbstoffe verbessern zwar nicht die Strukturhaltung, verhindern aber offenbar eine Extraktion des filamentösen Materials, da bei dieser Fixierung häufiger als sonst Mikrofilamente gefunden werden.

Ein ähnliches Resultat erhält man bei Anwendung von N-Äthylmaleimid (NEM). Mougeotiafäden wurden in Agar vorkultiviert und zehn Minuten nach Induktion der Bewegung durch 20 μmolare NEM-Lösung gestoppt und anschließend durch OsO_4 und Glutaraldehyd fixiert. Abb. 40 zeigt einen Ausschnitt des plastidären Cytoplasmas. Die einzelnen Filamente sind zu erkennen (Pfeil);

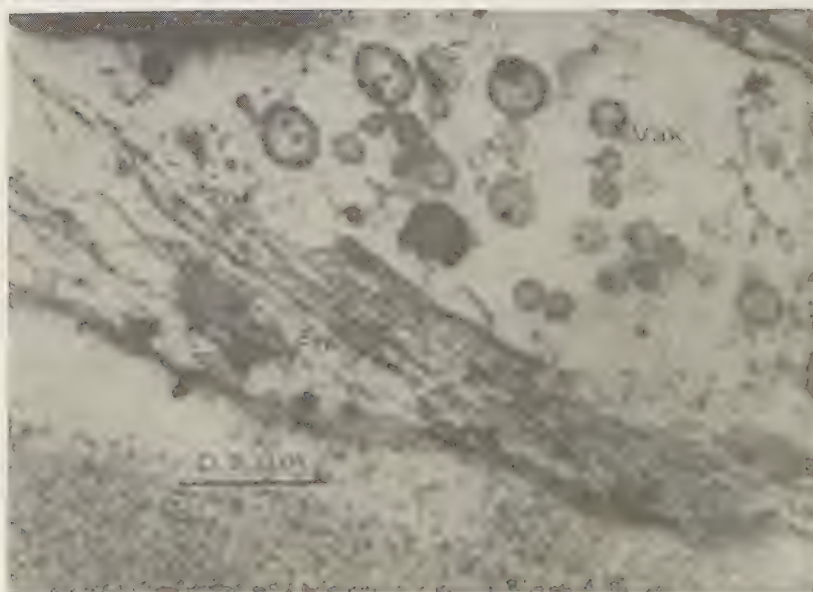
Abb. 40 und Abb. 41:

Ausschnittsvergrößerungen von Mougeotia-Zellen (Querschnitte).

Beide Abbildungen zeigen große Mikrofilamentbündel (Fil) im Übergangsbereich zwischen plastidärem (pl C) und corticalem Cytoplasma (co C).

Bei Abb. 40 zeigt sich die Fibrille nach NEM-Behandlung als lockeres Filamentnetzwerk, während nach Phalloidin-Inkubation (Abb. 41) die Filamente gerade ausgerichtet sind.

Weitere Details: Chloroplast (Chl), Vakuole (Vak) mit Vesikeln (V) und Zellwand (W).



jedoch in Form eines Filament-Netzwerkes. Während das übrige Cytoplasma extrahiert wurde, ist das filamentöse Material in großen Mengen erhalten.

Den größten Erfolg bei der Erhaltung von Mikrofilamenten bei *Mougeotia* zeigte jedoch Phalloidin, ein Gift des Grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* (WIELAND 1976, 1977). Phalloidin wurde in Konzentrationen von 50 - 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ der Fixierlösung zugegeben.

Unter Phalloidineinwirkung sind in *Mougeotia*-Zellen vermehrt Mikrofilamente nachweisbar. Die einzelnen Filamente sind - im Vergleich zu anderen Fixierungen - sehr lang und gerade (Abb. 41 und 43). Für einzelne Filamente, die durchgehend in der Schnittrichtung liegen, können Längen von etwa 1000 nm ermittelt werden. Diese Filamente sind somit etwas länger als die Aktinfilamente im quergestreiften Muskel (MANNHERZ und HOLMES 1977).

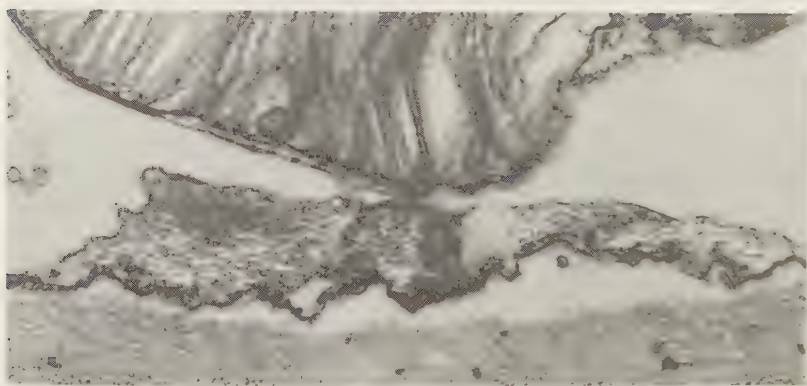
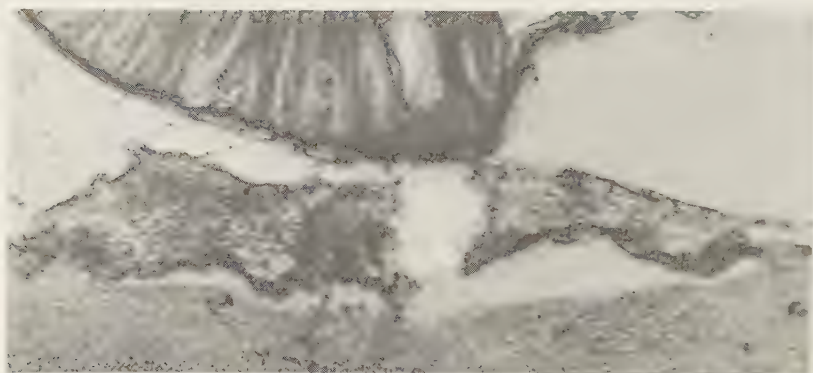
Die Abb. 42 - 46 zeigen eine Fibrille einer mit Phalloidin fixierten Zelle in mehreren, aufeinanderfolgenden Schnitten. Je nachdem, ob die Fibrille zentral oder peripher angeschnitten wurde, ergibt sich ein unterschiedliches Bild. Auf Abb. 42 sind im leeren Cytoplasma lediglich einige wenige Filamente zu erkennen. Auf Abb. 43 und Abb. 44 liegen die Filamente dicht gebündelt und ziehen vom Plastiden zum Plasmalemma. Abb. 45 und Abb. 46 lassen diese kontraktile Verbindung von Plastid und Plasmalemma nicht mehr erkennen; dieser periphere Anteil der Fibrillen befindet sich ausschließlich im corticalen Cytoplasma.

Abb. 42 - Abb. 46:

Ausschnittsvergrößerungen einer Mougeotia-Zelle (Querschnitte).

Abb. 42 bis Abb. 46 zeigen ein- und dieselbe Fibrille in mehreren, aufeinanderfolgenden Schnitten. In den ersten peripheren und zentralen Anschnitten ziehen die Mikrofilamente (Fil) vom Plastiden (Chl) zum Plasmalemma (Pl); in den letzten peripheren Anschnitten liegen die Filamente im corticalen Cytoplasma (co C).





3.03. Rekonstruktion typischer Chloroplasten-Gestalts- änderungen während der Bewegung

Es erschien verlockend, intrazelluläre Veränderungen der Chloroplastenform, die sich im Ablauf der Bewegung ergeben, elektronenoptisch zu demonstrieren. Hierzu wurden die Algen in festen Zeitabständen nach Bewegungsinduktion fixiert. Darüber hinaus mußte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, die Einfallsrichtung des induzierenden Lichtes genau festzustellen, um die jeweilige Phase der Bewegung zwischen Ausgangs- und Endstellung zu erkennen (siehe Material und Methoden).

Mit Hilfe dieser Methode kann man die Formveränderung der Chloroplasten während der Bewegung gut rekonstruieren, da Zellen, die auf das induzierende Licht nicht reagieren, im EM-Bild anhand der abweichenden Chloroplastenstellung leicht erkannt und ausgesondert werden können.

Die Reihe 1 der Abb. 47 zeigt Mougeotia-Zellen nach dem sogenannten "Richten auf Kante". Dies ist die Ausgangsstellung des Chloroplasten bei der durch hellrotes Licht induzierten Chloroplastenbewegung. Der Chloroplast nimmt unter diesen Bedingungen eine annähernd rechteckige Form ein, er zeigt keine lappenförmigen Ausbuchtungen der Kante und ist in seinem Durchmesser annähernd konstant.

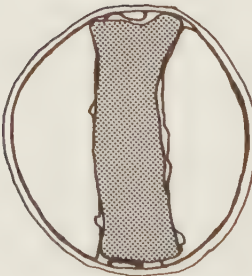
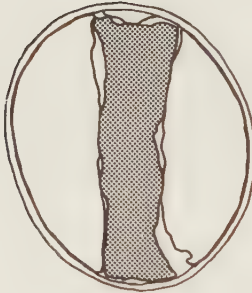
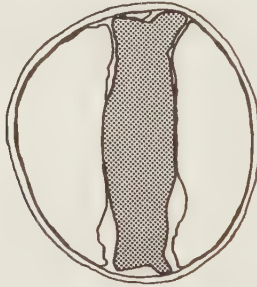
Relativ selten bleibt der Chloroplast während der Bewegung in dieser geraden Form (siehe Reihe 2 der Abb. 47), vielmehr scheint er sehr leicht verwindbar zu sein. In Reihe 3 der Abb. 47 sieht man Chloroplasten, bei denen eine Kante sich bereits von der Ausgangsstellung entfernt hat, während die andere noch keine Bewegung ausführte. Dadurch kommt es zu einer Krümmung des Chloroplasten.

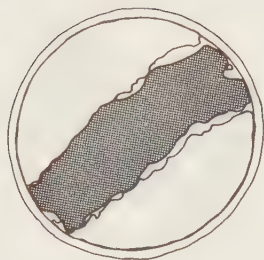
„Sehr häufig wird die Chloroplastenkante während der Bewegung in Fortsätze aufgespalten, als ob Zugkräfte an der Kante ansetzten und diese verformten. Es wurden

Abb. 47:

Schematisierte Querschnitte von Mougeotia.

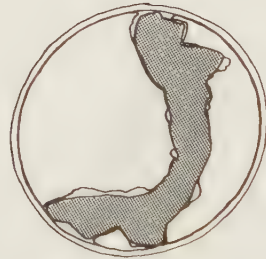
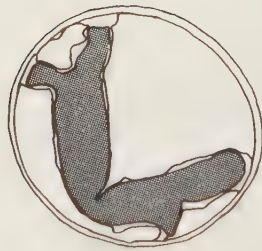
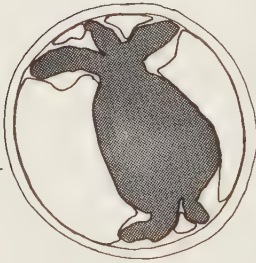
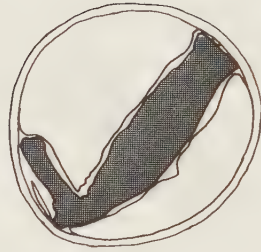
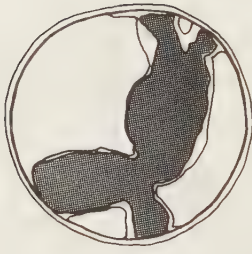
Schematisierte Zeichnungen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen für Mougeotia typische Gestaltsänderungen des Chloroplasten im Bewegungsablauf. Der Pfeil gibt die Einfallsrichtung des bewegungsinduzierenden hellroten Lichtes an.





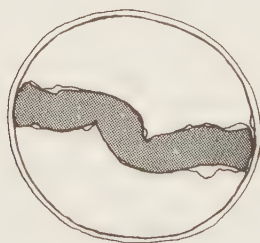
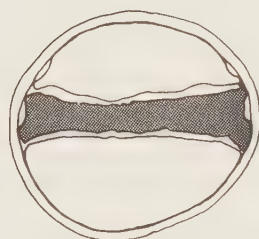
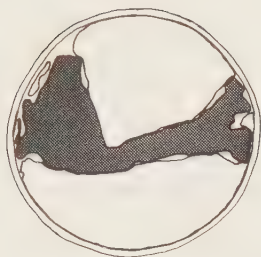
2

3



4

5



6

7

maximal drei lappenartige Fortsätze pro Kante gefunden. Reihe 4 der Abb. 47 zeigt solche Querschnitte. Durch die Ausbuchtung der Chloroplastenkante kommt ein großer Teil des Plastiden und des plastidären Cytoplasmas in räumliche Nähe zum corticalen Cytoplasma.

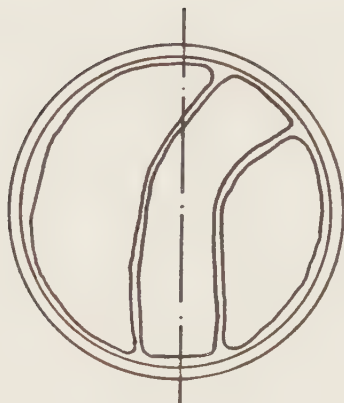
In Reihe 5 sind ähnliche Verhältnisse gezeigt; eine Kante ist schmal, die andere ausgebuchtet, wobei sich diese Ausbuchtung eng dem corticalen Cytoplasma anschmiegt.

Relativ selten findet man Aufbauchungen des Chloroplasten wie sie in Reihe 6 dargestellt werden.

Reihe 7 zeigt Chloroplasten nach Drehung in ihre Endstellung. Bei der ersten Zeichnung hat der Chloroplast die Drehung noch nicht vollständig ausgeführt, eine Ausbuchtung des Chloroplasten zeigt noch zur ursprünglichen Lichteinfallsrichtung. Bei den 2 weiteren Zellen ist die Drehung vollständig ausgeführt. Man erkennt die Ähnlichkeit zur Ausgangsstellung, nämlich schmale, nicht gelappte Kanten und keine oder geringe Verwindung der Chloroplasten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Chloroplast in Ausgangs- und Endstellung gerade ist, während er sich während der Bewegung vielfältig verformt. Um diesen Sachverhalt nicht nur wie in Abb. 47 zu demonstrieren, sondern auch zu quantifizieren, wurde als Maß für "Verformbarkeit" ein einfaches Kriterium gewählt: es wurde versucht am elektronenoptischen Bild des Zellquerschnittes durch den Chloroplasten, d.h. von Kante zu Kante eine Linie derart zu legen, daß sie vollständig innerhalb des Umrißes des Chloroplasten liegt (siehe Schemazeichnung). Dies gelingt nur bei geraden oder schwach gekrümmten Chloroplasten, nicht jedoch bei stark gewundenen. Es wurden die Querschnitte von 33 Zellen ausgewertet. Bei Zellen, deren Chloroplast auf Kante gerichtet worden war, ließ sich in 13 von 14 Fällen solch eine Linie ziehen (93 %), während bei Zellen, die zur Bewegung induziert worden waren, dies nur auf 2 von 17 Zellen (10,5 %) zutraf.

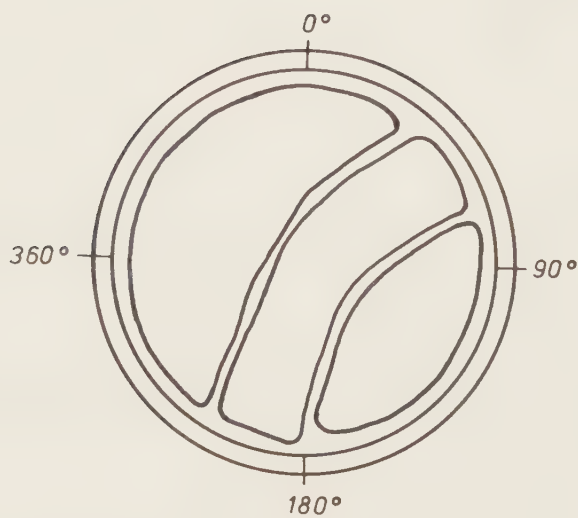
Schemazeichnung



3.04. Führung einer Chloroplastenkante während der Bewegung

Da auf den EM-Bildern mit dem neuen Verfahren (siehe 2.04) die Lichteinfallsrichtung gut zu bestimmen ist, läßt sich auch relativ leicht feststellen, welche Kante bei der Bewegung führt. Es ist bekannt, daß bei geringen bis mittleren Lichtintensitäten meist die lichtzugewandte Kante zuerst mit der Drehung beginnt (WACHTER 1979). Bei lichtmikroskopischer Betrachtung ist man geneigt, die Kante mit dem am stärksten ausgelappten Chloroplastenfortsatz als am weitesten gedreht anzusehen. EM-Untersuchungen haben den Vorteil, daß man nun die Stellung der Mitte der oberen oder unteren Kante objektiv vergleichen kann. Der Zellquerschnitt kann als Winkelkreis betrachtet werden, wobei die Lichteinfallsrichtung 0° entspricht. Die am weitesten auseinanderliegenden Berührungspunkte einer Chloroplastenkante mit dem corticalen Cytoplasma wird in Winkelgrad bestimmt und gemittelt. So kann dieser Wert für die obere, d.h. lichtzugewandte und die untere, d.h. lichtabgewandte, Kante verglichen werden (siehe Schemazeichnung). Es zeigt sich eine leichte Tendenz, daß die lichtzugewandte Seite schneller dreht. Bei 52 ausgewerteten Zellen, die 10 - 20 Minuten nach Bewegungsinduktion fixiert worden waren, führte in 32 Fällen die lichtzugewandte und in 20 Fällen die lichtabgewandte Chloroplastenkante.

↓ ↓ *HR*



3.05. Rekonstruktion der Mikrofilament-Verteilung in Mougeotia-Zellen

Für die Deutung der Bewegungsmechanik des Mougeotia-Plastiden ist die intrazelluläre Verteilung der Mikrofilamente wichtig, insbesondere ihre räumliche Beziehung zum Chloroplasten.

Darüber hinaus interessiert es, ob die Filamente während der Bewegung auf- und abgebaut werden, oder stets in ihrer funktionsfähigen Form bleiben. Denn nur das polymere F-Aktin kann elektronenoptisch nachgewiesen werden, und auch dann nur, wenn die Filamente in Form von Bündeln, sogenannten Fibrillen, auftreten. G-Aktin oder ein einzelnes Filament werden zwar abgebildet, können aber nicht als solches eindeutig erkannt werden. Beim Schleimpilz *Physarum polycephalum* ist solch ein schneller Wechsel zwischen G- und F-Aktin bekannt (WOHLFARTH-BOTTERMANN und ISENBERG 1976).

Zur Rekonstruktion der Filamentverteilung wurden Algenzellen in definierten Zeitabständen während der Bewegung fixiert. Pro Zelle wurde an einem Querschnitt die Fläche der angeschnittenen Filamentbündel ausgemessen. Die Fläche der angeschnittenen Fibrillen ist ein Maß für die Menge an vorhandenen Filamentbündeln. Um diese Meßwerte besser untereinander vergleichen zu können, wurde zur Standardisierung die Länge des zugehörigen Cytoplasmabelages gemessen und die Fläche der Fibrillenschnitte stets auf Cytoplasmalänge bezogen. Es wurde dabei das corticale und plastidäre Cytoplasma unterschieden, sowie das Cytoplasma im Übergangsbereich, also dort, wo der Chloroplast mit seinem ihm umgebenden Cytoplasmabelag das corticale Cytoplasma berührt.

Teilt man nun die Meßwerte derart in Gruppen ein, daß jeweils Zellen 10 Minuten, 20 Minuten ... nach Bewegungsinduktion eine Klasse bilden, so bliebe die Tatsache unberücksichtigt, daß die Plastiden die Bewegung unter-

schiedlich schnell ausführen. Gerade bei mittleren Zeiten sind einige Chloroplasten fast noch in Ausgangsstellung, während andere schon annähernd die Endposition einnehmen. Deshalb erschien es sinnvoller, die Zellen individuell nach Stellung ihrer Chloroplasten in drei Klassen einzuteilen, nämlich Anfang, Mitte und Ende der Bewegung. Hierbei ist darauf hinzuweisen, daß "Anfang" bereits zur Bewegungsphase gehört und nicht die Ausgangsstellung der Bewegungsinduktion meint.

Es wurden auf diese Weise zwei verschiedene Präparationen ausgewertet, nämlich eine Simultanfixierung mit Osmiumtetroxid und Glutaraldehyd in Collidinpuffer, pH 6,9 (Fixierung A), und ebenfalls eine Simultanfixierung in MXS, pH 6,1 (Fixierung B), wobei in diesem Falle die Bewegung vor Zugabe der Fixierlösung durch N-äthylmaleimid ($20 \mu\text{mol l}^{-1}$) gestoppt wurde. Ziel dieser NEM-Behandlung war es, die Interaktion von Aktin und Myosin zu verhindern, und damit eventuell eine bessere Fixierung der Filamente zu erreichen.

Die Darstellung der Filamente unterscheidet sich bei beiden Fixierungen. Bei Methode A sind die Filamente zu einer körnigen Struktur aufgelöst und entsprechend dicht, während sie bei Fixierung B als lockeres Knäuel von Einzelfilamenten erscheinen.

In Abb. 48 ist die Fläche der Filamentbündel in den drei verschiedenen Cytoplasmabereichen, sowie der Gesamtwert dargestellt. Es fällt auf, daß die Gesamtmenge an Filamenten während der Bewegung zunimmt und gegen Ende wieder abfällt. Während aller drei Bewegungsphasen wird die größte Menge an Filamenten im corticalen Cytoplasma gefunden, wobei der Wert bei Halbzeit des Bewegungsablaufes ein Maximum durchläuft. Obwohl der Übergangsbereich nur einen kleinen Teil des gesamten zellulären Cytoplasmas ausmacht, findet man hier sogar etwas mehr oder fast genauso viel Filamente wie im plastidären Cytoplasma. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn man nicht die absolute

Fläche der angeschnittenen Fibrillen, sondern die Fläche pro zugehörige Cytoplasmalänge aufträgt (Abb. 49). Jetzt zeigt sich die relativ geringe Konzentrierung von elektronenoptisch nachweisbaren kontraktilen Proteinen im plastidären Cytoplasma, während der Übergangsbereich eine höhere Konzentration aufweist.

Der Wert für das corticale Cytoplasma liegt immerhin noch höher als der Wert für das gesamte zelluläre Cytoplasma. Es ist ein Abfall der Konzentration an kontraktilen Proteinen im corticalen Cytoplasma und im Übergangsbereich am Ende der Bewegung festzustellen.

Bei Fixierung B (Abb. 50) erkennt man sofort, daß die Fläche an angeschnittenen Fibrillen während der Bewegung wesentlich größer ist als bei Fixierung A, während sie zu Bewegungsende bei beiden Fixierungen gleich ist. Dies ist durch die größere Zahl an getroffenen Filamentbündeln bedingt, nicht etwa aufgrund einer Durchmesser- vergrößerung der einzelnen Bündel. Während bei Fixierung A drei bis fünf Bündel im Mittel pro Schnitt gefunden wurden, liegt der Wert für Fixierung B bei sieben Bündeln während der Bewegung. Der Querschnitt der einzelnen Fibrille ist mit ca. $0,1 \mu\text{m}^2$ für beide Fixierungen während der Bewegung gleich. Es scheint, als ob bei Fixierung B durch den Zusatz von NEM vielleicht weniger Fibrillen extrahiert wurden.

Am Ende der Bewegung ist wieder eine geringere Menge an Filamenten erhalten als während der Chloroplastendrehung, ebenso ist die Zahl der Fibrillen pro Schnitt erniedrigt. Auch hier besitzt das corticale Cytoplasma bei weitem die meisten Filamente. Das plastidäre Cytoplasma dagegen weist die wenigsten Mikrofilamente auf, obwohl es einen größeren Anteil am Gesamtcytoplasma ausmacht als der Übergangsbereich. Bezieht man die Fläche wieder auf die zugehörige Cytoplasmalänge (Abb. 51), so wird der Unterschied deutlicher. Die höchste Konzentration an kontraktilen Proteinen liegt im Übergangsbereich vor, die niedrigste im plastidären Cytoplasma. Die Konzentration an kontraktilen Proteinen fällt

Abb. 48:

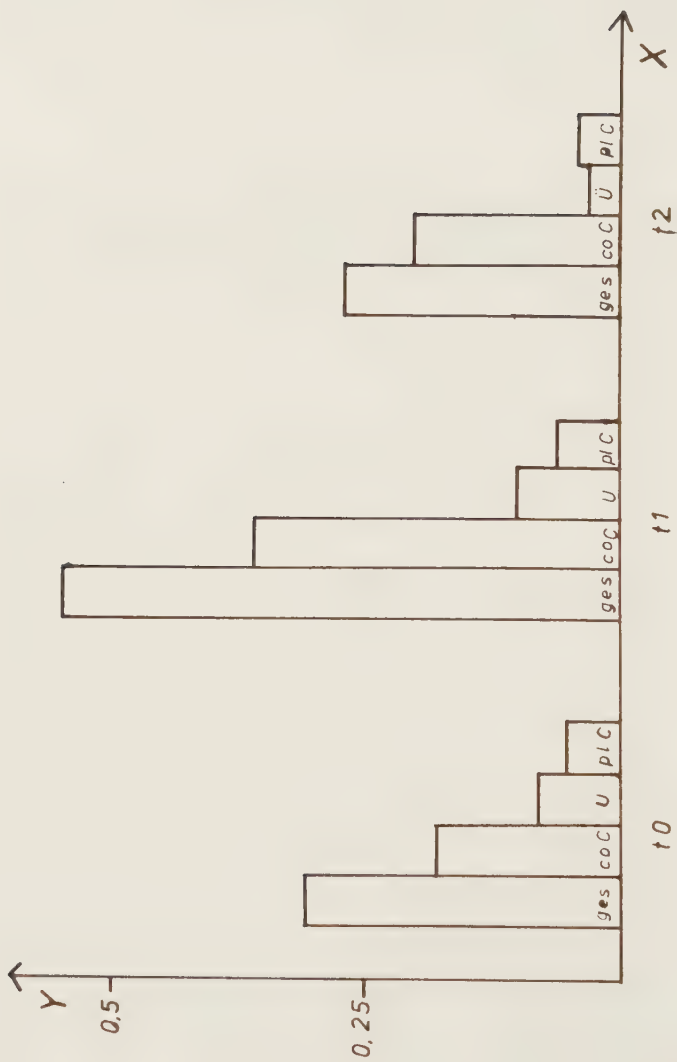
Durchschnittliche Menge an angeschnittenen Filamentbündeln eines Zellquerschnittes (Einheit μm^2) im gesamten Cytoplasma und in den einzelnen Cytoplasmabereichen zu Bewegungsbeginn (t_0), -halbzeit (t_1) und -ende (t_2) des Plastiden. (Fixierung A)

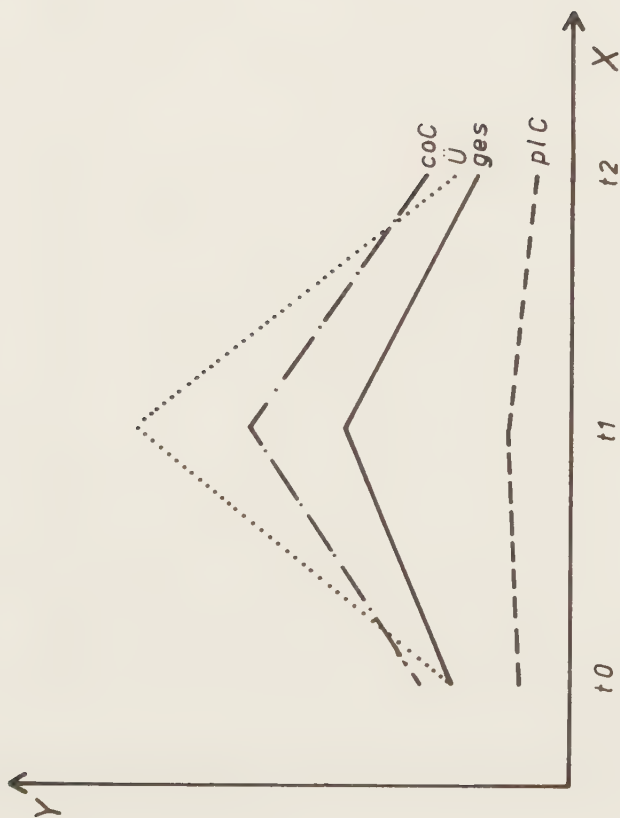
Abb. 49:

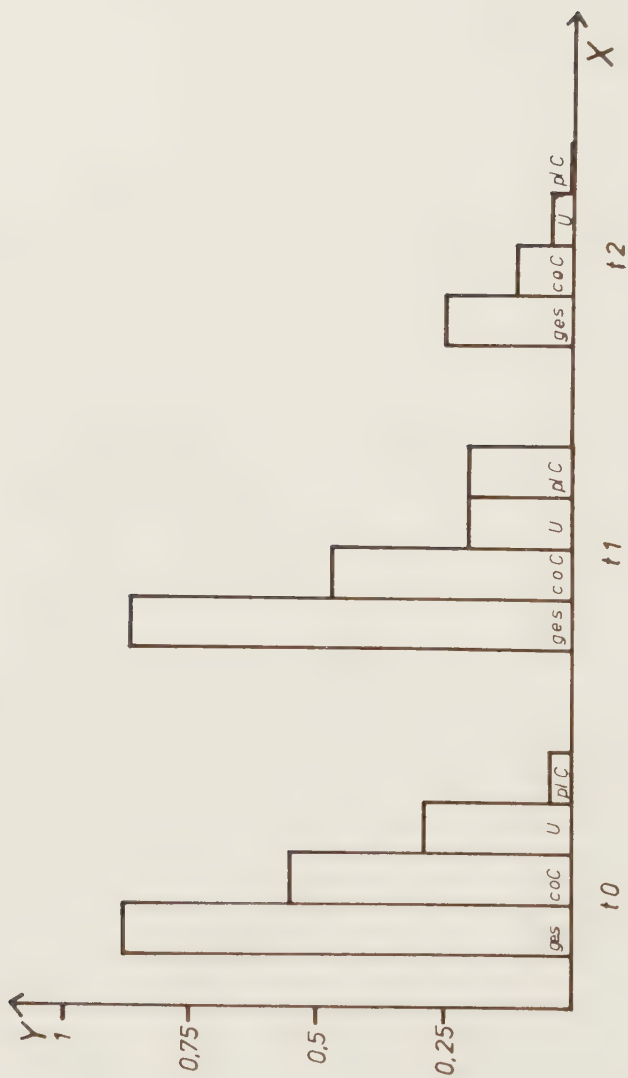
Durchschnittliche Menge an angeschnittenen Filamentbündeln eines Zellquerschnittes im gesamten Cytoplasma und in den einzelnen Cytoplasmabereichen normiert auf die jeweils zugehörige Cytoplasmalänge (Einheit $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) zu Bewegungsbeginn (t_0), -halbzeit (t_1) und -ende (t_2) des Plastiden. (Fixierung A)

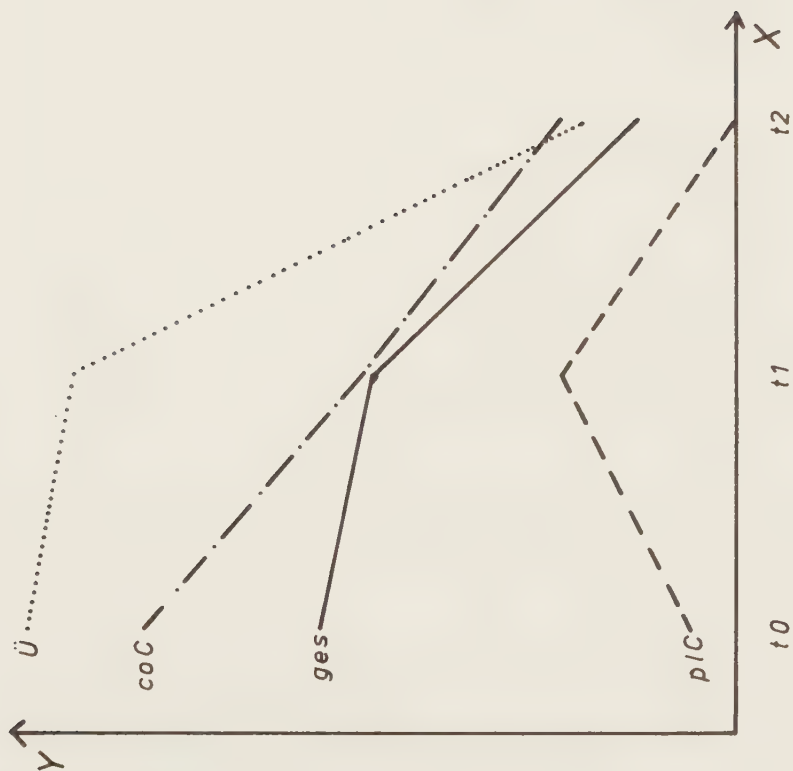
Abb. 50 und 51:

Siehe Abb. 48 und 49. (Fixierung B)









während der Bewegung im corticalen Cytoplasma und im Übergangsbereich stetig ab, bis sie in beiden Kompartimenten schließlich gleich sind.

Diese Ergebnisse sollten erst ein Ansatz für weitere, statistisch untermauerte Untersuchungen zur Verteilung der Mikrofilamente während des Bewegungsablaufes sein, da hierfür aufgrund der außerordentlich hohen biologischen Variabilität ein wesentlich höherer Stichprobenumfang erforderlich ist, als er in dieser Arbeit vorliegt. Insbesondere wäre es interessant, ob noch zusätzlich eine Vorzugsverteilung in Bezug auf die Lichteinfallrichtung vorliegt. Bisherige Untersuchungen brachten hierfür noch keine nennenswerten Ergebnisse.

3.06. Rekonstruktion der Cytosomen- und Mitochondrien- verteilung in Mougeotia-Zellen

Die Verteilung der Cytosomen und der Mitochondrien innerhalb der Zelle und eine mögliche Veränderung dieser Anordnung während der Bewegung erscheint aus zwei Gründen interessant.

Zum ersten speisen die Mitochondrien energetisch die durch kurze Belichtung induzierte, dann aber in Dunkelheit ablaufende Schwachlichtbewegung des Mougeotia-Plastiden (FETZER 1963).

Zum zweiten ist das schwerlösliche Calcium in der Mougeotia-Zelle für die Schwachlichtbewegung wichtig (WAGNER und KLEIN 1978). Gerade diese Calcium-Fraktion könnte aber in den Cytosomen vorhanden sein, wie die Ergebnisse von WAGNER und ROSSBACHER 1980 vermuten lassen. Aufgrund dieser Tatsachen wäre es zu erwarten, daß Mitochondrien und Cytosomen in bestimmten Zellbereichen gehäuft auftreten.

Für diese Untersuchung wurden die Cytosomen bzw. Mitochondrien in drei Gruppen eingeteilt: Organelle im Übergangsbereich, im corticalen Cytoplasma und im plastidären Cytoplasma. Zur Auswertung der Cytosomen wurde von 88 Zellen jeweils ein Querschnitt herangezogen. Insgesamt wurden 1288 Cytosomen ausgezählt (siehe Tab. 1).

In der Bewegungsruhe des Plastiden vor Induktionsbelichtung liegen 53,5 % der Cytosomen im plastidären Cytoplasma; dagegen befinden sich nur 29 % im corticalen Cytoplasma. Der Übergangsbereich besitzt 17,5 % der Gesamtzahl an Cytosomen.

Die meisten im plastidären Cytoplasma auftretenden Cytosomen liegen in direkter Nachbarschaft der Kante; denn innerhalb des plastidären Cytoplasmas ist eine große Ungleichverteilung festzustellen. Teilt man das plastidäre Cytoplasma in drei gleich große Bereiche, zwei

kantennahe und einen mittleren Bezirk, so treten die Cytosomen gehäuft in den kantennahen äußeren Dritteln des plastidären Cytoplasmas auf. Nur 16,1 % der Cytosomen des plastidären Cytoplasmas liegen im zentralen Drittel; 83,9 % jeweils in den zwei kantennahen Bezirken. Umgerechnet in Absolutprozenten bedeutet dies, daß 44,8 % der Gesamtzahl an Cytosomen im plastidären Cytoplasma in der Nähe der Kante liegen und nur 8,6 % im zentralen Bereich des plastidären Cytoplasmas. Zusammen mit den 17,5 % des Übergangsbereiches ergibt dies, daß 62,3 % aller Cytosomen in der Nähe der zwei Kanten liegen.

Die Cytosomen zeigen also ihre höchste Konzentration in der Nähe der Kante. Die Bedeutung dieses Bezirkes wird noch dadurch unterstrichen, daß im Ablauf der Chloroplastenorientierung, die Cytosomen sich hier anhäufen. Die Menge an Cytosomen im Übergangsbereich steigert sich von 17,5 % vor Induktionsbelichtung auf 34,3 % in zwanzig Minuten nach Induktionsbelichtung. Diese Steigerung ist statistisch signifikant. Zu Bewegungsende nach vierzig Minuten sinkt die Menge an Cytosomen im Übergangsbereich wieder auf 19,5 %. Dagegen verringert sich im plastidären Cytoplasma der Gehalt an Cytosomen während der Bewegung von ursprünglich 53,5 % auf 43,2 % und steigt zu Bewegungsende wieder auf 51,0 %, erreicht also fast den Ausgangswert. Diese Unterschiede sind ebenfalls statistisch signifikant.

Auch bei Halbzeit des Bewegungsablaufes sind die Cytosomen im plastidären Cytoplasma ähnlich ungleich verteilt wie vor der Bewegung: 37,5 % der Gesamtzahl an Cytosomen befinden sich in den äußeren zwei Dritteln des plastidären Cytoplasmas, dagegen nur 5,7 % im mittleren Bereich des plastidären Cytoplasmas. Direkt an den zwei Kanten befinden sich zwanzig Minuten nach Bewegungsinduktion 34,3 % der Cytosomen; in unmittelbarer Nähe der Chloroplastenkante noch zusätzlich 37,5 %, insgesamt also 71,8 % aller Cytosomen. Da Cytosomen schwerlösliches Calcium enthalten (WAGNER und ROSSBACHER

Tabelle 1

Prozentuale Verteilung der Cytosomen in Mougeotia-Zellen

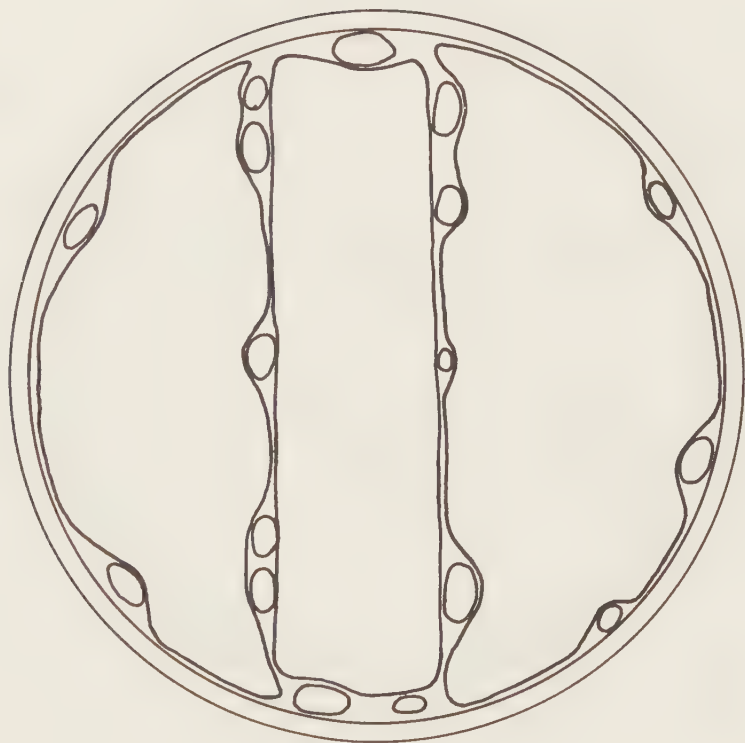
Cyto- plasma- bezirk	Zeit nach Be- wegungsin- duktion				
	0'	10'	20'	30'	40'
	(n=28)	(n=31)	(n=10)	(n=11)	(n=8)
Übergangsbereich	17,5 %	26,2 %	34,3 %	25,2 %	19,5 %
plastidäres Cytoplasma	53,5 %	40,1 %	43,2 %	42,6 %	51,0 %
corticales Cytoplasma	29 %	33,7 %	22,5 %	32,2 %	29,5 %

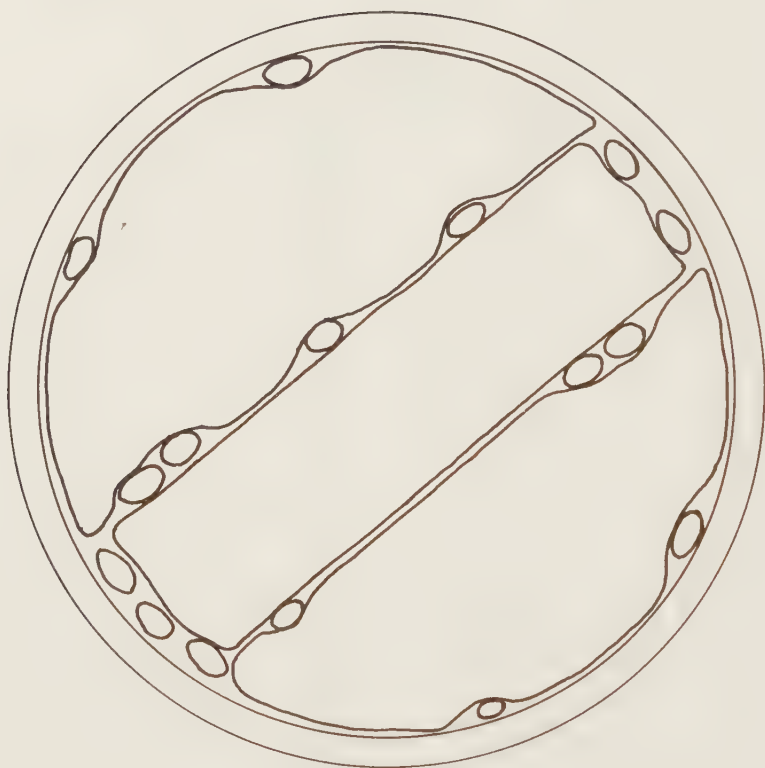
Abb. 52:

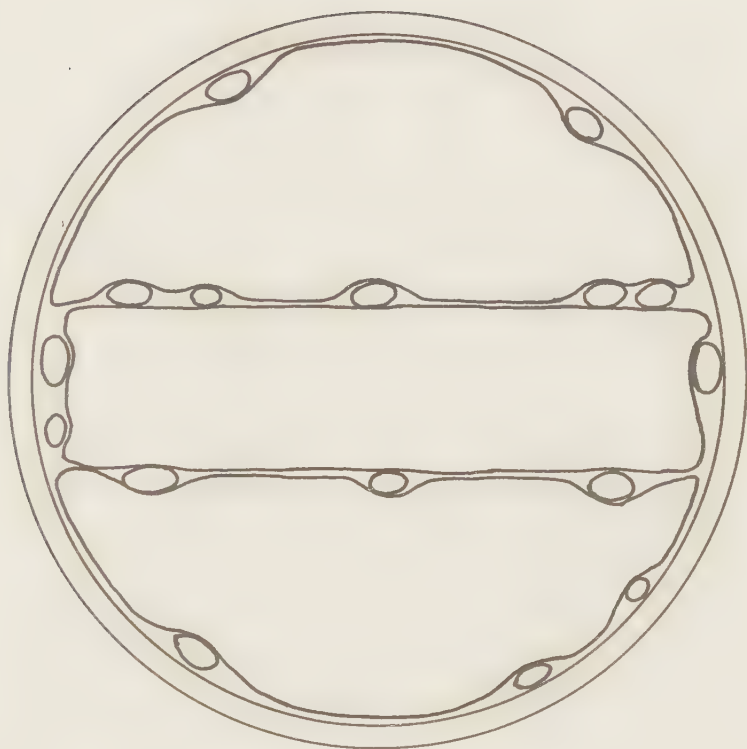
Rekonstruktion der Cytosomen-Verteilung in Mougeotia-Zellen.

- a) vor Bewegungsinduktion
- b) bei Halbzeit des Bewegungsablaufes
- c) bei Bewegungsende.

↓ HR







1980) und da eine Fraktion an schwerlöslichem Calcium mit der Bewegungsfähigkeit korreliert, demonstriert dieses Ergebnis die Anhäufung gespeicherten Calciums an einem für die Bewegung kritischen Ort.

Die Mitochondrien verteilen sich in der Zelle anders als die Cytosomen (Tab. 2). Zwar liegt vor Bewegungsinduktion ein annähernd gleicher Prozentsatz der Mitochondrien im plastidären Cytoplasma, nämlich 68,5 %. Im Gegensatz zu den Cytosomen nimmt dieser Prozentsatz aber während der Bewegung ständig zu, bis nach vierzig Minuten 90,7 % aller Mitochondrien sich im plastidären Cytoplasma befinden. Vergleichbar mit den Cytosomen treten die Mitochondrien bevorzugt in den zwei äußeren, kantennahen Dritteln des plastidären Cytoplasmas auf; dort liegen rund 2/3 aller Mitochondrien der Zelle. Dagegen ist der zentrale Bereich des plastidären Cytoplasmas schwach besetzt. Im restlichen, der Wand anliegenden Cytoplasma, nimmt die Zahl der Mitochondrien von 31,5 % auf 9 % ab. Diese Werte entsprechen der Summe von Übergangsbereich und corticalem Cytoplasma, die bei dieser Versuchsreihe nicht getrennt ausgewertet wurden. Während die Cytosomen am Ende der HR-induzierten Schwachlichtbewegung wieder die gleiche Verteilung zeigen wie nach dem "Richten auf Kante" mittels Weißlicht, ist bei den Mitochondrien der Endzustand völlig verschieden vom Zustand vor der Induktionsbelichtung. Cytosomen und Mitochondrien verteilen sich während der Bewegung also unabhängig voneinander in der Mougeotia-Zelle.

Tabelle 2

Prozentuale Verteilung der Mitochondrien in Mougeotia-Zellen

Cyto- plasma- bezirk	Zeit nach Be- wegungsin- duktion				
	0'	10'	20'	30'	40'
	(n=12)	(n=37)	(n=13)	(n=14)	(n=10)
Corticales Cytoplasma + Übergangsbereich	31,5 %	24,7 %	25,9 %	16,7 %	9,3 %
plastidäres Cytoplasma	68,5 %	75,3 %	74,1 %	83,3 %	90,7 %

3.07. Beeinflussung der Motorik des Mougeotia-Chloroplasten durch physiologisch aktive Substanzen

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß einige Hemmstoffe von kontraktilen Proteinen die Bewegungsfähigkeit des Mougeotia-Chloroplasten vermindern, wie z.B. PCMB (SCHÖNBOHM 1969) und Cytochalasin B (WAGNER 1974).

N-Äthylmaleimid:

Ein weiterer Inhibitor, der sich für den indirekten Nachweis von Aktomyosin eignet, ist N-Äthylmaleimid (NEM). NEM unterbindet die ATPase-Funktion von Myosin. 1975 setzten CHEN und KAMIYA NEM ein, um im Endoplasma von Nitella Myosin nachzuweisen.

NEM löste sich sehr langsam im MXS-Medium, andererseits zerfiel es sehr leicht, wobei die Lösung stark sauer wurde. Deshalb wurden die Lösungen täglich frisch angesetzt.

NEM hemmt im Bereich zwischen 2,5 und 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NEM konzentrationsabhängig die Chloroplastenbewegung bei Mougeotia. Geringe Konzentrationen bis 2,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NEM haben keinen sichtbaren Effekt; Konzentrationen über 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NEM hemmen die Bewegung total (Abb. 53).

Der Schluß liegt nahe, daß an der Plastidenbewegung von Mougeotia nicht nur Aktin, sondern auch Myosin beteiligt ist.

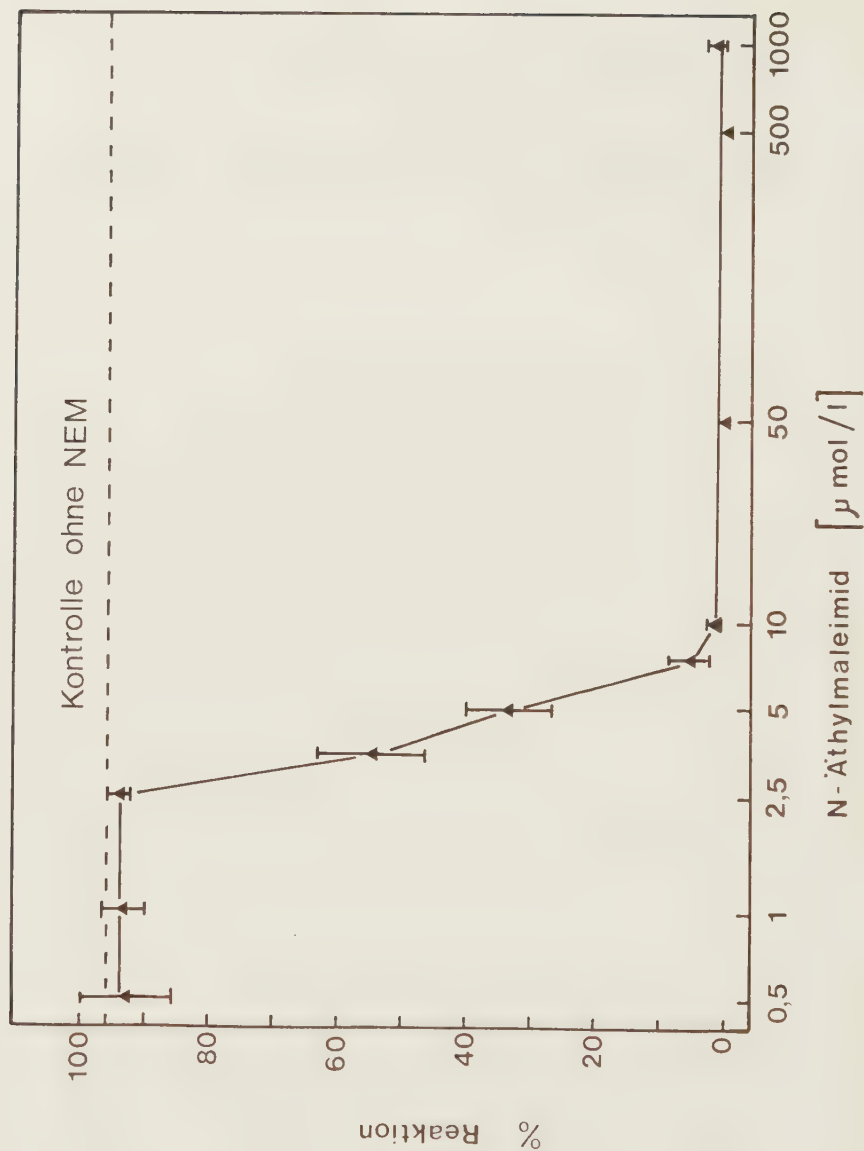
Phalloidin:

Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob Phalloidin, ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes Amanita phalloides, einen Einfluß auf die Orientierungsbewegung des Mougeotia-Chloroplasten hat. Phalloidin drängt das Gleichgewicht G-Aktin $\longrightarrow$ F-Aktin auf die Seite des polymeren F-Aktins und stabilisiert dieses (LENGSFELD et al. 1974; DANCKER et al. 1975; POLLENDER und GRUDA 1979).

Abb. 53:

Chloroplastendrehung bei Mougeotia im kontinuierlichen Weißlicht (Schwachlichtbewegung).

Es ist der Prozentsatz an Zellen, die nach einstündiger Belichtung in NEM-haltiger MXS-Lösung ($\text{pH} = 6$) reagiert haben, in Abhängigkeit von der Konzentration an NEM aufgetragen.



So müßte die Chloroplastenbewegung bei Mougeotia durch Phalloidin behindert werden, falls Polymerisations- oder Depolymerisationsvorgänge des Aktins daran beteiligt sind. Leider durchdringt Phalloidin äußerst schlecht Zellmembranen, mit Ausnahme menschlicher und tierischer Leberzellen (SCHIMASSEK und JECKEL 1978; JAHN 1977; AGOSTINI et al. 1977). Wahrscheinlich ist dies die Ursache dafür, daß in den meisten Experimenten Phalloidin in Konzentrationen von $50 - 100 \mu\text{mol l}^{-1}$ die Chloroplastenbewegung bei Mougeotia nicht beeinflusste. In einigen wenigen Versuchen jedoch verminderte es die Reaktion von 82 % auf 11 %.

Es wäre vorstellbar, daß nur in diesen Experimenten das Toxin in die Zellen gelangt ist und die Bewegung beeinflussen konnte.

Eventuell dringt Phalloidin besser in die Zelle ein, wenn Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vermittler für eine besseren Penetration durch die Membranbarriere verwendet wird. Es erscheint sinnvoll, diese Versuche nochmals mit DMSO zu wiederholen.

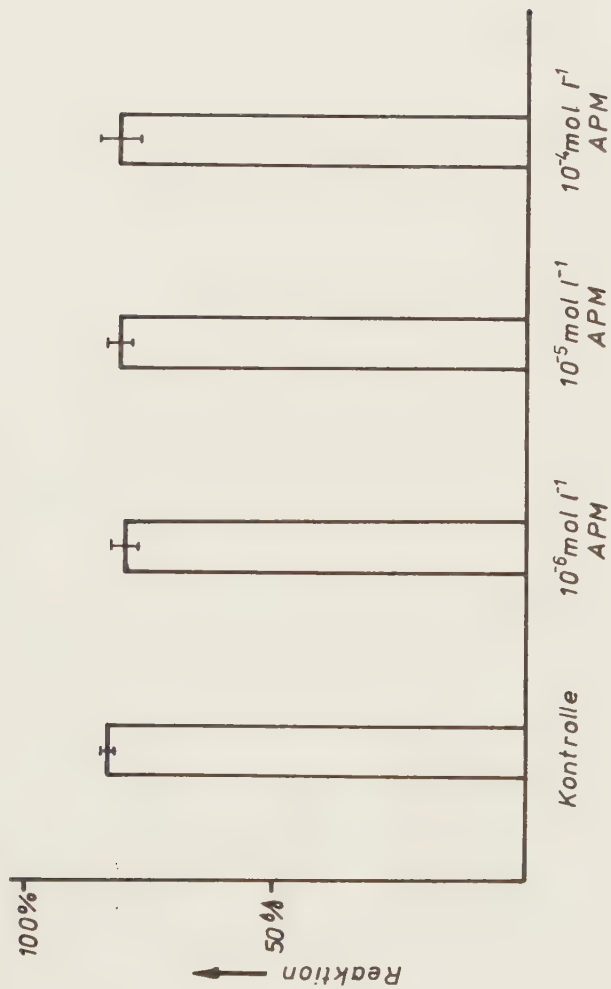
Amiprophosmethyl:

Amiprophosmethyl (APM) gilt als Mikrotubuliheimmstoff, der bei Chlamydomonas reinhardtii in einer Konzentration von einigen $\mu\text{mol l}^{-1}$ die gleiche Wirkung zeigt wie Colchicin in einer Konzentration von einigen mmol l^{-1} (QUADER et al. 1977). Abb. 54 zeigt, daß APM in Konzentrationen von $10^{-4} - 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ die Hellrot-induzierte Chloroplastenbewegung von Mougeotia nicht beeinflusst. Dies würde bedeuten, daß Mikrotubuli nicht an der Drehung des Mougeotia-Chloroplasten beteiligt sind. In die gleiche Richtung weisen auch Versuche von FOOS (1970). Jedoch bleibt zu bedenken, daß der genaue Wirkungsmechanismus von APM noch nicht gesichert ist. Es wirkt wahrscheinlich über eine Veränderung des Calcium-Gehaltes des Cytosols (HERTEL et al. 1980).

Abb. 54:

Chloroplastendrehung bei Mougeotia nach kurzer Hellrot-Induktion.

Mougeotia-Zellen zeigen nach einstündiger Inkubation in APM-haltiger MXS-Lösung mit 1 % (v/v) DMSO unverminderte Reaktion auf Induktionsbelichtung mit hellrotem Licht (Auswertung: 40 Minuten nach Bewegungsinduktion).



3.08. Protein-Eluation und HMM-Infiltration zur Aktin-Identifizierung in Mougeotia-Zellen

Als überzeugender Nachweis, daß es sich bei intrazellulären Mikrofilamenten um F-Aktin handelt, gilt die Dekorierung mit HMM.

Prinzipiell kann eine situ-Dekorierung an Material ausgeführt werden, das nachfolgend konventionell fixiert und eingebettet wird, oder es kann der Nachweis an isoliertem, filamenthaltigem Cytoplasma durchgeführt werden.

Die in situ-Dekorierung von Aktin führte aufgrund der speziellen Schwierigkeiten bei Mougeotia zu keinem Erfolg. Dennoch sollen die Versuche beschrieben werden, da es bei fortentwickelter Methodik in Zukunft vielleicht doch möglich sein sollte, Aktinfilamente innerhalb der Mougeotia-Zelle nachzuweisen. Das intakte Plasmalemma und die Wand erweisen sich bei der lebenden Zelle als Barriere, die das Eindringen des großen HMM-Moleküls (Molekulargewicht 350 000 d) behindert. Deshalb ist es üblich, das Versuchsobjekt mehrere Tage in Glycerin zu inkubieren, damit die Membran permeabler und das leichtlösliche Cytoplasma extrahiert wird (ALLÉRA et al. 1971). Mikrofilamente und größere Zellorganelle überstehen diese Behandlung.

Gibt man Mougeotia-Zellen in eine 50 %ige (v/v) Glycerinlösung, so kommt es zur Plasmolyse. Der Cytoplasmaschlauch löst sich augenblicklich von der Zellwand ab. Gelegentlich bleibt jedoch der Chloroplast an einer Querwand hängen und löst sich nur von der gegenüberliegenden Wand. Manchmal kommt es auch zu Zerreißen des Chloroplasten, falls er an beiden Querwänden festhaften bleibt. Auch ein sofortiger Austausch der Glycerinlösung gegen MXS führt nicht mehr zur Deplasmolyse. Die Auswirkungen einer so intensiven Glycerinierung sind irreversibel.

Nach mehrtägiger Glycerinierung mit nachfolgender Entglycerinierung kann man auch im elektronenoptischen Bild kaum noch intakte Zellstrukturen feststellen. Selbst der Chloroplast ist nicht mehr erkennbar.

Auf Abb. 55 sieht man ein Stärkekorn, globuläre Partikel unbekannter Herkunft und Ribosomen. Auch bei allen anderen untersuchten Zellen findet man in großer Menge filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 6 nm. Diese Filamente lagern sich gelegentlich zu Strängen zusammen (siehe Pfeil), meist bilden sie jedoch Filamentnetzwerke. Man kann sich gut vorstellen, daß es sich bei diesen Anhäufungen von filamentösen Strukturen (siehe Punkte) um Filamentbündel der intakten Zelle handelt. Eine Lagebeziehung der Fibrillen zum Chloroplasten ist nicht herzustellen.

Verkürzt man die Glycerinierungsdauer auf 3 - 24 Stunden, so verbessert sich auch die Strukturerhaltung. Abb. 56 zeigt eine Zelle nach dreistündiger Behandlung mit 50 % Glycerin. Leider wird das Cytoplasma auch unter diesen Bedingungen so stark eluiert, daß eine Zuordnung der Filamentknäuel zum Chloroplasten unmöglich ist. Abb. 57 zeigt einen Ausschnitt eines Plastiden, der von vielen Filamentanhäufungen umgeben ist, die scheinbar "frei" in der Zelle liegen.

Inkubiert man die Algen nach erfolgter Glycerinierung und Entglycerinierung mit einer HMM-Lösung (2 mg HMM/ml), so erkennt man zwar an einigen Filamenten globuläre Auflagerungen, aber nirgendwo ein Pfeilspitzenmuster (siehe Abb. 58). Eine Dekorierung war also nicht durchführbar.

Es wurde ausprobiert, ob anstelle einer Verkürzung der Glycerinierungsdauer eine Verminderung der Glycerinkonzentration zum Erfolg führen würde. Die Algen wurden, nachdem ihr Chloroplast auf Kantenstellung gerichtet worden war, 90 Sekunden mit Hellrot induziert. 5 Minuten nach Bewegungsinduktion wurden sie in MXS mit 3 % Glycerin

Abb. 55:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Einige Details einer Mougeotia-Zelle sind nach mehrtägiger Inkubation in 50 %iger (v/v) Glycerinlösung noch zu erkennen. Mikrofilamente in Form von Netzwerken (siehe +) oder Strängen (siehe Pfeil) sind zu erkennen, ebenso wie Ribosomen (R) und ein Stärkekorn (St).

Abb. 56:

Querschnitt durch eine Mougeotia-Zelle.

Nach dreistündiger Inkubation in 50 %iger (v/v) Glycerinlösung hat sich der Chloroplast (Chl) von der Zellwand (W) zurückgezogen. Das plastidäre Cytoplasma (pl C) ist im Gegensatz zum corticalen Cytoplasma noch zu erkennen. Weitere Details: Zellwand (W) mit Schleimschicht (S), Vakuole (Vak) und eine Anhäufung von Vesikeln (V).

Abb. 57:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Nach dreistündiger Inkubation in 50 %iger (v/v) Glycerinlösung hat sich der Chloroplast (Chl) von der Zellwand zurückgezogen. Neben dem Plastiden liegen mehrere Filamentbündel (Fil). Reste des plastidären Cytoplasmas (pl C) sind zu erkennen. Weitere Details: Stärke (St) und Vakuole (Vak).

Abb. 58:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Mikrofilamente nach mehrstündiger Inkubation der Mougeotia-Zelle in 50 %iger (v/v) Glycerinlösung und nachfolgender HMM-Infiltration zeigen an einzelnen Stellen globuläre Auflagerungen (siehe Pfeil). Weitere Details: Reste des Cytoplasmas (C) und Membranen (M).

Abb. 59:

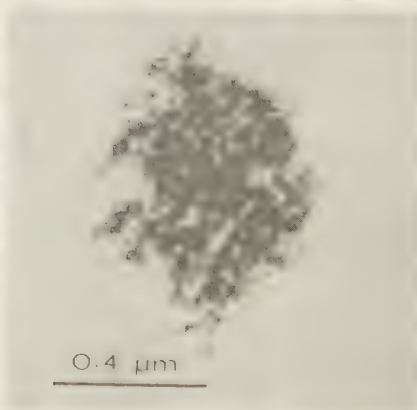
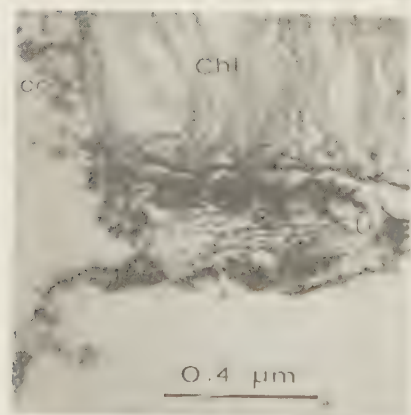
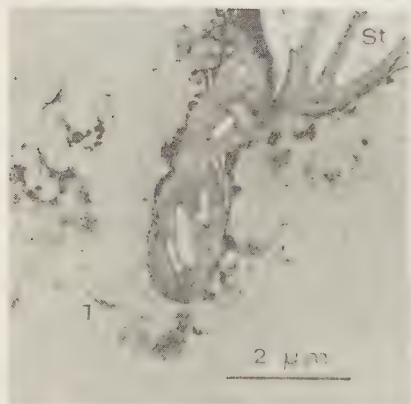
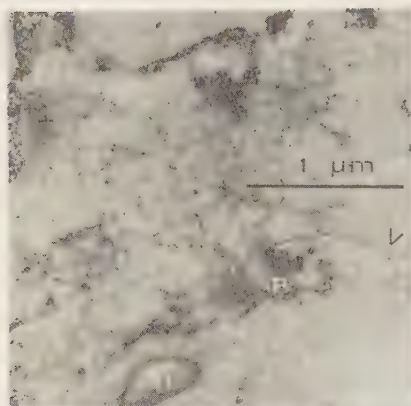
Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Mikrofilamente (Fil) liegen im Übergangsbereich (Ü).
Nach vierstündiger Inkubation in 3 %iger (v/v) Glycerinlösung und anschließender HMM-Infiltration zeigen die Mikrofilamente globuläre Anlagerungen.
Weitere Details: Chloroplast (Chl) und corticales Cytoplasma (co C).

Abb. 60:

Ausschnittsvergrößerung einer Mougeotia-Zelle (Querschnitt).

Ein Mikrofilamentbündel liegt im plastidären Cytoplasma, dessen Grundsubstanz extrahiert ist. Nach 30minütiger Inkubation in 0,1 %iger (v/v) Triton-X-100-Lösung und anschließender HMM-Infiltration zeigen die Mikrofilamente globuläre Anlagerungen (siehe Pfeil).



überführt und dort für 4 Stunden belassen. Nach einstündiger Entglycerinierung wurden sie mit HMM (2 mg/ml) inkubiert. Die Strukturhaltung ist wegen der geringen Glycerinkonzentration erwartungsgemäß recht gut. Man findet, wie Abb. 59 zeigt, globuläre und periodische Anlagerungen undefinierten Materials an den Filamenten. Ein eindeutiges arrowhead-Muster ist wiederum nicht zu erkennen.

Auch der Einsatz von 2-5 % Äthanol anstelle von Glycerin unter Zusatz von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Phalloidin ergab keine besseren Resultate, ebenso wie eine langsame Steigerung der Glycerinkonzentration in 14 Stufen auf 30 % Endkonzentration.

Weiterhin wurde das Detergenz Triton X 100 eingesetzt, das in künstlichen, zweischichtigen Lipidmembranen Poren ausbildet (SCHLIEPER und DE ROBERTIS 1977).

Bei einer Konzentration von 0,1 % (v/v) ist die günstigste Einwirkungszeit ca. 1/2 Stunden. Bei längeren Zeiten löst sich der Plastid auf und Chlorophyll tritt aus. Die Algen werden nach der Tritonisierung gründlich gewaschen und über Nacht in HMM (2 mg/ml) inkubiert. Die Strukturhaltung ist recht gut. Es konnten mit dieser Methode erstmals Filamentanlagerungen entdeckt werden, die Ähnlichkeiten mit dem Pfeilspitzenmuster haben (Abb. 60).

Insgesamt können bei allen in diesem Abschnitt angewandten Verfahren Filamente mit der für Aktin erforderlichen Größenordnung festgestellt werden. Bei anschließender Inkubation mit HMM zeigen die Mikrofilamente häufig Anlagerungen, jedoch kein ausgeprägtes Pfeilspitzenmuster. Eine Ursache hierfür könnte sein, daß trotz des Einsatzes membranlysierender Substanzen neben dem Plasmalemma auch die Zellwand und die äußere Schleimschicht eine zu starke Barriere für das Eindringen von HMM darstellen.

Deshalb erscheint es zweckmäßiger, die Zellwand enzymatisch zu entfernen und Mougeotia-Protoplasten zur Aktinidentifizierung einzusetzen.

3.09. Aktin-Identifizierung durch HMM-Dekorierung an
gespreiteten Mougeotia-Protoplasten und Trennung
des Aktin-HMM-Komplexes durch ATP (ATP-Kontrolle).

Eigene Vorversuche zeigten, daß die zur Herstellung von Protoplasten üblicherweise verwandten Enzyme Cellulase und Pektinase bei Mougeotia unbrauchbar sind. Es erscheint in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß die Zellwand von Mougeotia nach einer Behandlung gemäß der THIÉRY-Methode keine positive Reaktion (Schwarzfärbung) zeigt. Dies läßt bereits auf einen für Algen typischen komplexen Zellwandaufbau schließen (siehe WARTENBERG 1972), und somit ergibt sich die Schwierigkeit, die richtige Enzymkombination zu finden.

1977 beschrieben MARCHANT und FOWKE eine Methode unter Verwendung der Enzyme Macerase und Cellulysin. Hierfür eignen sich lediglich schnell wachsende oder im Teilungsstadium befindliche Mougeotia-Zellen.

Bei den üblichen Erddekot- oder MXS-Kulturen erhält man nur einzelne Protoplasten, da die Wachstumsrate zu gering ist und der Teilungsvorgang zum Experimentieren zeitlich ungünstig, nämlich nachts, abläuft (NEUSCHELER-WIRTH 1970). Eine Umstellung des Tag-Nacht-Wechsels bei Mougeotia und Abernten am Tage erhöht die Ausbeute an Protoplasten. Die besten Ergebnisse werden jedoch bei einer von STABENAU (1978) beschriebenen Kulturmethode erzielt. Obwohl hierbei Dauerlicht ohne Tag-Nacht-Rhythmus verwendet wird und es sich um ein rein synthetisches Nährmedium relativ hoher Ionenkonzentration handelt, wachsen die Algen äußerst gut. Makroskopisch hat man den Eindruck, daß etwa drei Tage nach Ansetzen der Kultur die Algen sich stark zu vermehren beginnen; nach 7-10 Tagen kann ein 500 ml-Kolben abgeerntet werden. Die dichte Algenwatte erscheint dunkelgrün und die einzelnen Zellen sind Mougeotia-Zellen aus ENS-Kulturen vergleichbar. Insbesondere ist keine Chloroplastenschrumpfung, wie sie als zelluläre Reaktion auf Streßbedingungen auftritt (SCHORER-MÖRTEL 1972), feststellbar. Auf häufig

stattfindende Zellteilungen deutet die Kürze der Zellen und die schwache Ausbildung der Querwände hin. Ferner findet man immer wieder Chloroplasten zu Beginn ihrer Querteilung. Dies äußert sich durch eine Einschnürung des Plastiden in seiner Mitte.

Abb. 61 zeigt die Verteilung der Zelllängen von Mougeotia in einer STABENAU-Kultur in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden in 24stündigen Abständen jeweils an 10 Algenfäden 5 hintereinanderliegende Zellen ausgemessen. Innerhalb eines Fadens befanden sich die Zellen meist in der gleichen Wachstumsphase. Die Zelllänge variierte um den Faktor 4-5, wobei innerhalb der Gesamtpopulation die Zelllängendifferenz 231 μm betrug, mit einem Minimum von 67 μm und einem Maximum von 298 μm .

Die Zelllänge wurde in 7 Klassen aufgeteilt:

- I: 58,4 μm bis unter 87,6 μm
- II: 87,6 μm bis unter 116,8 μm
- III: 116,8 μm bis unter 146,0 μm
- IV: 146,0 μm bis unter 175,2 μm
- V: 175,2 μm bis unter 204,4 μm
- VI: 204,4 μm bis unter 233,6 μm
- VII: 233,6 μm bis unter 262,8 μm

Nach eintägiger Kultur findet man kurze, mittlere und lange Zellen ohne offensichtliche Bevorzugung einer bestimmten Klasse, mit Ausnahme von I und VII, die schwach besetzt sind. Ab dem dritten Tag jedoch zeigt sich eine Verschiebung zugunsten kleinerer Zelllängen: Klasse IV, V, VI und VII sind kaum besetzt, während ein Gipfel im Bereich von 117-146 μm liegt. Ab dem vierten Tag liegt das Maximum bei Klasse II, Zelllängen von 88-117 μm dominieren. Diese Verhältnisse ändern sich nicht, solange günstige Wachstumsbedingungen in der Kultur herrschen. Algen aus der beschriebenen Durchlüftungskultur zeigen eine gute Schwachlichtreaktion. Tab. 3 zeigt ein Beispiel nach fünftägiger Kultur.

Abb. 61:

Die Länge von Mougeotia-Zellen, aufgeteilt in 7 Klassen, ist in Abhängigkeit von der Kultur-Dauer in STABENAU-Medium aufgetragen.

Der Stichprobenumfang pro Tag beträgt 50 Zellen.

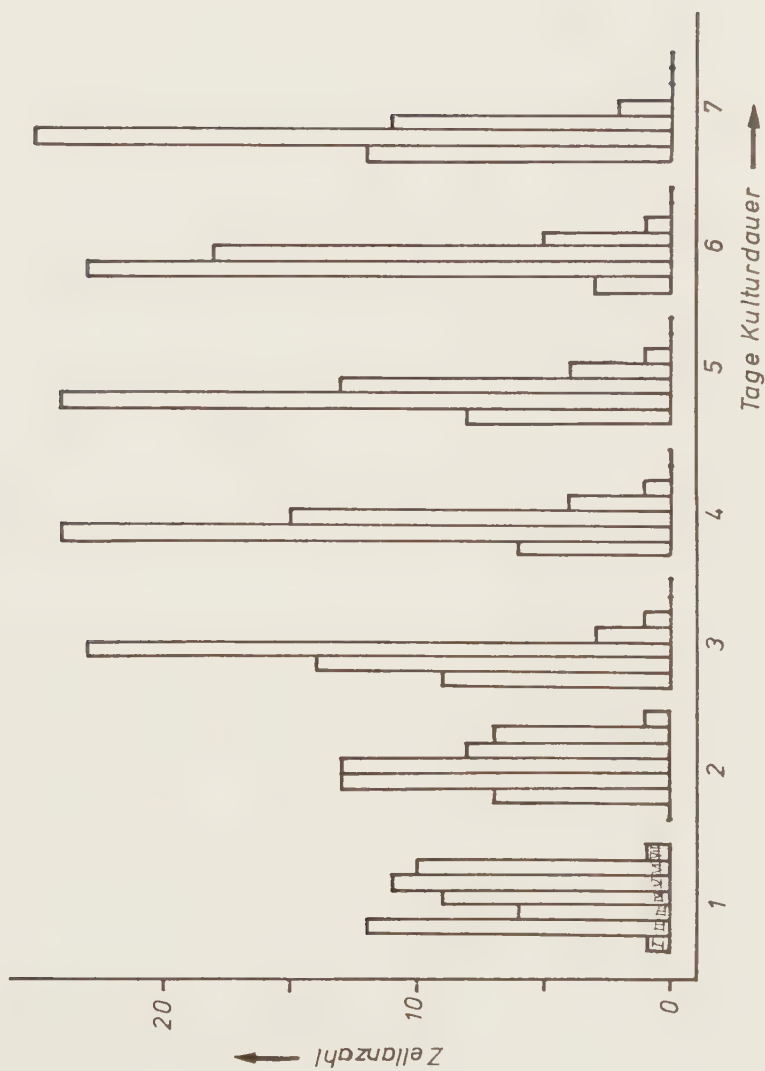


Tabelle 3

Schwachlichtreaktion in %			
10'	20'	30'	40'
44 $\pm 4,0$	78 $\pm 3,7$	92 $\pm 3,7$	96 $\pm 2,4$

Pro Mittelwert wurden jeweils 50 Zellen ausgewertet.
Es wurde zusätzlich der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben.

Erfahrungsgemäß werden die höchsten Ausbeuten an Protoplasten erzielt, wenn man die Algen nach 3-4tägiger Kultur verwendet. Es scheint, als ob unter diesen Bedingungen die Zellwand besonders leicht für die Enzyme Macerase und Cellulysin angreifbar ist. Es können bis zu 50 % der Algen in Protoplasten überführt werden. Bei gleichem Algenmaterial sinkt die Ausbeute bei Temperaturen unter 23 °C stark ab, während bei Temperaturen über 27 °C Zellen und Protoplasten im Enzymmedium absterben bzw. zerplatzen. Die Protoplasten werden stets in der Mitte der Längswand entlassen; sehr häufig sieht man Stadien, bei denen der Protoplast an der Durchtrittsstelle eingeklemmt ist und erst durch Schütteln des Gefäßes "befreit" wird. Die Querwände und die übrig gebliebenen Längswände der einstigen Zellen werden nicht abgebaut; dies stimmt mit den Ergebnissen von MARCHANT und FOWKE (1977) überein. Die Protoplasten runden sich nach ihrem Durchtritt durch die Zellwand ab. Ihre Größe hängt neben ihrer ursprünglichen Zellgröße von der Tonizität ihrer Suspensionslösung ab. Abb. 62 zeigt einen solchen Protoplasten. Der Chloroplast windet sich spiralig oder bandförmig auf.

Der Protoplast ist unter diesen Bedingungen leicht manipulierbar und kann mit einer 20 µl-Pipette auf ein kohlebedampftes, Poly-L-Ornithin-befilmtes Netzchen aufgebracht werden. Die Kohlebedampfung erhöht die mechanische Beanspruchbarkeit des dünnen Formvarfilmes. Poly-L-Ornithin ist ein Polykation, so daß die Gridoberfläche positiv aufgeladen ist. Da der Protoplast an seiner Außenseite negative Ladungen trägt, bleiben die Membranbruchstücke des infolge osmotischer oder mechanischer Belastung geplatzten Protoplasten an der Netzchenoberfläche haften, ohne bei den nachfolgenden Manipulationen weggespült zu werden. Bei der zuerst verwandten Methode werden die Netzchen mit einer MXS-Lösung unter Zusatz von 1 mmol l⁻¹ ATP, 1 mmol l⁻¹ MES und 0,1 % (v/v) Triton X 100, pH 6,75 gespült.



Abb. 62 a, b:

Mougeotia-Protoplast

Die NOMARSKI-Aufnahme zeigt einen Mougeotia-Protoplasten nach Entfernung der Zellwand in zwei optischen Schnitten, median (a) und tangential (b).

Triton X 100 ist ein nicht-ionisches Detergenz (SCHLEMPER und DE ROBERTIS 1977; CLARKE 1977), das die Membranbruchstücke von der Zelldebris befreit. ATP läßt bei *Vaucheria sessilis* die Fibrillen klarer erscheinen, indem es den Filamenten anhaftende Organelle freisetzt (BLATT et al. 1980). Es wurde deshalb auch bei den Versuchen mit *Mougeotia* der Spüllösung zugegeben.

Nach dem ersten Arbeitsschritt spült man mit der gleichen Lösung, jedoch ohne Zusatz von Triton X 100 solange, bis das Detergenz vollständig entfernt ist. Dies ist an dem Wiederauftreten der üblichen Oberflächenspannung zu erkennen.

Anschließend wird mit 1 %iger (g/v) wässriger Uranylacetatlösung negativ kontrastiert und die Netzchen an der Luft getrocknet. Diese Methode hat den Vorteil, daß Membranbruchstücke, fibrillöses Material und Organelle relativ klar und sauber im Bild erscheinen. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, daß offensichtlich der größte Teil an zellulärem Material abgespült wird.

Deshalb wurde eine Methode von ISENBERG und WOHLFARTH-BOTTERMANN (1976) modifiziert (KLEIN, WAGNER und BLATT 1980). Protoplasten heften sich - wie oben beschrieben - an die Oberfläche der Netzchen und können mechanisch oder osmotisch zum Platzen gebracht werden. Aufgrund der Oberflächenspannung befinden sich nicht festhaftende Membranbruchstücke und Cytoplasma an der Tropfenoberfläche. Mit Hilfe eines zweiten, kohleverstärkten und Poly-L-Ornithin-befilmten Grids kann man die Zellbruchstücke von der Tropfenoberfläche abnehmen. Mikrofilamente haften leicht an diesem Grid, mit welchem allein weiter experimentiert wird. Dieses Netzchen wird mit Tris-Puffer (5 mmol l^{-1} , pH = 7) unter Zusatz von 5 mM MgCl_2 , $0,1 \text{ M KCl}$ und $0,1 \%$ Triton X 100 gespült. Anschließend wird mit der gleichen Lösung ohne Triton X 100 gespült und mit 1 %iger wässriger Uranylacetatlösung nachkontrastiert.

Abb. 63:

Rupturierter und gespreiteter Mougeotia-Protoplast (Negativ-Kontrastierung).

Abb. 63 zeigt zwei isolierte, in sich gewundene Mikrofilamentbündel. Der Durchmesser der einzelnen Filamente beträgt 5,5 nm. Die Pfeile deuten eine periodische Musterung im Abstand von 35-40 nm an.

Abb. 64:

Rupturierter Mougeotia-Protoplast (Negativ-Kontrastierung).

Lockeres Netzwerk von Mikrofilamenten (Fil), die auf Bruchstücken des Plasmalemmas liegen. Einzelne Filamente lagern sich zu einem gemeinsamen Strang zusammen (siehe Pfeil).



Abb. 63 zeigt ein in sich gewundenes Bündel von Mikrofilamenten. Die einzelnen Filamente liegen dicht nebeneinander und haben einen Durchmesser von 6 nm, wie er häufig für Aktinfilamente gefunden wird. An einer Stelle ist andeutungsweise eine Querbänderung in Abständen von 35-40 nm festzustellen (siehe Pfeile); dieser Wert stimmt recht gut mit dem für die Schraubenwindung der doppelsträngigen Helix des F-Aktins angegebenen Wert von 36,5 nm (MANNHERZ und HOLMES 1977), bzw. mit den für Physarum-Aktinfilamente ermittelten 35 nm (BRITZ 1979) überein. Der Durchmesser der Fibrille beträgt 33-72 μ m.

Abb. 64 dagegen zeigt einen Ausschnitt aus dem ersten Grid, auf welchem der Protoplast platzte. Im Unterschied zum vorhergehenden Bild liegen hier die Filamente membran-gebunden vor, umgeben von einer Schicht undefinierbaren Zellmaterials. Außerdem sind sie in diesem Falle weniger stark geordnet. Die einzelne Fibrille ist locker gebündelt. Der Durchmesser der Filamente liegt mit 10-15 nm deutlich über den auf Abb. 63 gemessenen 6 nm. Dies ist eventuell durch anhaftendes Zellmaterial (siehe auch BUCKLEY et al. 1978) zu erklären und wohl auch dadurch, daß sich mehrere Einzelfilamente zusammenlagern. An der mit Pfeil markierten Stelle winden sich zwei Einzelfilamente zu einem Doppelstrang. Die Filamente sind optisch schlechter auflösbar als die aus Abb. 63.

Man sieht am Beispiel dieser zwei Bilder, daß ein Abtupfen der Zellbruchstücke mit Hilfe eines zweiten Grids erhebliche Vorteile bringt. Zum einen bleiben mehr Mikrofilamente erhalten, zum anderen kann man dennoch die gleiche optische Qualität erzielen wie bei der Verwendung von Triton X 100. Mikrofilamente sind bei diesen Präparationen sehr häufig zu finden, z.T. einzeln, z.T. als lockere Bündel oder extrem angehäuft wie in Abb. 63.

Um die Aktinnatur dieser Filamente nachzuweisen, bedarf es einer Dekorierung mit heavy meromyosin, HMM. Das Grid wird hierzu mit einer Lösung von HMM (2 mg/ml) in Tris-

Abb. 65 und Abb. 66:

Rupturierter und gespreiteter Mougeotia-Protoplast (Negativ-Kontrastierung).

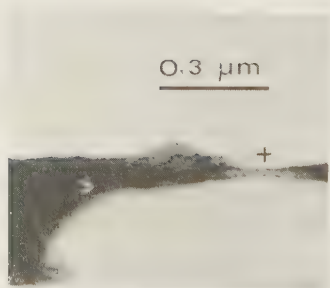
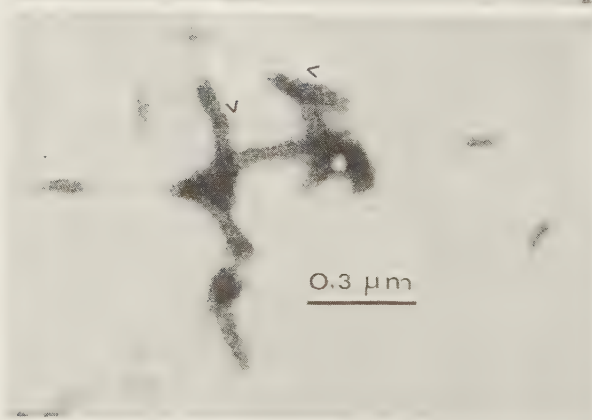
Einzelne liegende Mikrofilamente nach Dekorierung mit HMM: Die Filamente sind deutlich aufgerauht und lassen an einigen Stellen (siehe Pfeile) die Polarität der HMM-Aktin-Komplexe erkennen.

Abb. 67:

Rupturierter und gespreiteter Mougeotia-Protoplast (Negativ-Kontrastierung).

Mikrofilamente nach Dekorierung mit HMM und anschließender ATP-Inkubation:

Die Filamente sind deutlich dünner (siehe Pfeil) als in den Abb. 65 und 66; sie zeigen keine HMM-Aktin-Komplexe, sondern erscheinen glatt. Auf dieser Abbildung lagern sich die einzelnen Filamente zu einem gemeinsamen Strang zusammen (siehe +).



Maleat-Puffer (5 mM/l; pH = 7) 1-5 Minuten lang inkubiert, anschließend mit Tris-Maleat-Puffer gespült, negativ kontrastiert und an der Luft getrocknet.

Ohne Ausnahme erscheinen alle untersuchten Filamente dem Auge nach dieser Behandlung "aufgerauht". Sie sind mit einem Durchmesser knapp über 20 nm deutlich dicker als Filamente ohne HMM-Behandlung. Filamente mit 6 nm Durchmesser treten nach dieser Behandlung nicht mehr auf.

Abb. 65 zeigt einen typischen Ausschnitt. An einigen Präparaten kann man sogar die Polarität des Pfeilspitzenmusters feststellen. In Abb. 66 erkennt man an den gekennzeichneten Stellen die einzelnen HMM-Köpfchen mit ihrer Vorzugsrichtung. Dies ist ein Beweis, daß es sich bei den untersuchten Mikrofilamenten um F-Aktin handelt.

Die Bindung von Myosin an Aktin wird, wie aus der Muskelphysiologie bekannt, durch ATP gelöst. Zur Kontrolle werden Grids nach Inkubation mit HMM mit einer ATP-haltigen (1 mmol l^{-1}) MES-Lösung ($0,3 \text{ mmol l}^{-1}$; pH = 6,8) gewaschen und wie üblich weiterbehandelt. HMM wird unter diesen Bedingungen vom Aktinfaden freigesetzt, so daß das Filament wieder als pures Aktinfilament vorliegt. Tatsächlich besitzen nach dieser Behandlung die Filamente ausnahmslos wieder einen Durchmesser von 6 nm und erscheinen dem Auge nicht mehr aufgerauht, wie auf Abb. 67 zu sehen. Diese Kontrollexperimente sind ein guter Hinweis, daß es sich bei den vorher beschriebenen Dekorierungen tatsächlich um eine Komplexbildung von HMM mit Aktin handelt, da hierfür die gezeigte ATP-Reversibilität ein typisches Charakteristikum ist.

4. DISKUSSION

4.01. Erörterung der allgemeinen Zellmorphologie und verschiedener Fixierungsmethoden

Im folgenden werden die gezeigten Einzelstrukturen der Grünalge Mougeotia in einen funktionellen Zusammenhang gebracht und mit Einzelergebnissen von KAJA (1966), PUISEUX-DAO und LEVAIN (1963) und FOOS (1971) verglichen.

Zum plattenförmigen Chloroplasten der Mougeotia-Zelle liegen widersprüchliche Angaben vor. So beschreiben PUISEUX-DAO und LEVAIN den Mougeotia-Plastiden als durchgehend lamelliert, und unter günstigen Kulturbedingungen frei von Grana. Z.T. finden sie auch Invaginationen der Thylakoidmembranen, die als Vorläufer der später in der Evolution auftretenden Grana interpretiert werden können.

KAJA (1966) weist im Lamellarsystem junger Mougeotia-Chloroplasten "kurze, dicke Lamellen" nach, "die durch Einfaltung der Thylakoidmembran entstanden sind. Derartige Erscheinungen werden als Teilungsstadien gedeutet. Durch mehrfache Teilungen werden Thylakoidstapel (Grana) gebildet, an denen sich die zu ihrer Entstehung führende Teilungsfolge ablesen läßt."

FOOS (1970) entdeckt lichtmikroskopische Strukturen mit 0,4 µm Durchmesser, die er als Grana interpretiert.

In dem für diese Arbeit fixierten Algenmaterial lassen sich zwar hin und wieder frei endende Thylakoide finden (siehe Abb. 3 und 4), nirgends aber Granastapel, wie sie für höhere Pflanzen typisch sind. Die Thylakoide durchziehen im allgemeinen den Plastiden der Länge nach. Infolge der starken Verformbarkeit des Chloroplasten ist dieser häufig gekrümmt und unterschiedlich breit.

Gerade an diesen Einschnürungen sind die Thylakoide aneinandergeschoben. Bei einer Aufspaltung der Plastidenkante in Lappen laufen die Thylakoide von ihrer prinzipiellen Längsrichtung abweichend in die Ausbuchtungen hinein; dies wurde bereits von FOOS (1970) beschrieben.

Die Mitochondrien gehören dem sacculären Typ an. Bei den meisten Fixierungen sind diese Organelle aufgetrieben. Auf Abb. 29 ist die Doppelmembran mit dem perimitochondrialen Raum deutlich zu erkennen.

Unter dem Einfluß von NEM, das eingesetzt wurde, um die Plastidenbewegung bereits vor Fixierungsbeginn zum Stillstand zu bringen (siehe Seite 66), zeigen die Mitochondrien ein verändertes Aussehen: die Matrix ist kontrastreicher und erscheint dichter. Die sacculi sind extrem aufgeschwollen, so daß die Matrix wie schmale Stege zwischen den Hohlräumen aussieht. Diese Veränderung der Morphologie der Mitochondrien erscheint plausibel, da NEM ganz allgemein die Aktivität von SH-haltigen Enzymen hemmt (CHEN und KAMIYA 1975) und vielfältige Wirkungen auf die Ionenflüsse der Mitochondrien ausübt (DIWAN et al. 1977).

Das endoplasmatische Retikulum umgibt bei *Mougeotia* den gesamten Plastiden mit einer einzelnen Reihe von Zisternen bzw. Vesikeln (über das Auftreten beider Formen siehe Seite 50). Ähnliche Verhältnisse sind z.B. bei den Phaeophyceen und weiteren Klassen von Algen bekannt (GIBBS 1979), sowie auch bei einigen höheren Pflanzen (RENAUDIN und CAPDEPON 1977; PACINI und CRESTI 1976).

Von besonderem Interesse sind die Dictyosomen des Golgi-Apparates aufgrund ihres konstanten Auftretens im äußeren Drittel des plastidären Cytoplasmas. Sie behalten ihre Lage auch während der Plastidenbewegung bei. Diese Tatsache spricht gegen die Hypothese, daß der Chloroplast eventuell in einem Endoplasmazyylinder

entlang einer dünnflüssigen Schicht rotiert.

In pflanzlichen Dictyosomen kann Glucose über verschiedene Zucker in Pektin, Hemicellulose und Schleime von Polysaccharid-Natur umgewandelt werden. In den Golgi-Vesikeln werden diese Stoffe durch das Cytoplasma zur Peripherie transportiert und dort durch das Plasmalemma geschleust. Ihr Inhalt kann dann in die Zellwand eingebaut werden (siehe NULTSCH 1971). Es gibt einige Faktoren, die vermuten lassen, daß bei *Mougeotia* der Golgi-Apparat die gleiche Aufgabe besitzt.

Zum ersten scheint das ER bei *Mougeotia* die Dictyosomen zu speisen (siehe Abb. 11) (vgl. MOLLENHAUER und MORRÉ 1976).

Zum zweiten könnte die enge räumliche Lage von Plastid, ER und Golgi-Apparat einen Stofftransport zwischen diesen Strukturen gewährleisten. Tatsächlich findet man auch gelegentlich Aufnahmen, die einen Membrankontakt zwischen ER und Plastid vermuten lassen (siehe Abb. 3 und 4).

Zum dritten befinden sich häufig im Cytoplasma zwischen Zellwand und Dictyosom Anhäufungen von Vesikeln, wie sie in Abb. 14 und Abb. 15 zu erkennen sind.

Diese Vesikel ähneln morphologisch den Golgi-Vesikeln. Darüberhinaus findet man immer wieder Vesikel zwischen dem corticalen Plasmaschlauch und der Zellwand (siehe Abb. 19-22), die dort als Transportstrukturen auftreten könnten.

Die aufgeführten Fakten lassen stark vermuten, daß auch bei *Mougeotia* der Golgi-Apparat Aufgaben bei der Synthese von Zellwandmaterial besitzt.

Bei Übersichtsaufnahmen der *Mougeotia*-Zelle fällt die große Anzahl an Vesikeln, speziell an osmiophilen Cytoplasmen auf, die in der älteren Literatur als Gerbstoffbläschen oder Physoden (FOOS 1971) bezeichnet wurden.

PUISEUX-DAO und LEVAIN beschreiben zwei Typen von Physoden. Die einen sind wahrscheinlich mit den von den Dictyosomen abgeschnürten Vesikeln identisch und werden z.T. in die Vakuole abgegeben (siehe auch Abb. 16). Der zweite Typ ist ebenfalls von einer einfachen Membran umgeben; diese Vesikel enthalten Gerbstoffe, sind sehr osmiophil und erscheinen deshalb schwarz, wobei die Grundsubstanz häufig granuliert ist. PUISEUX-DAO und LEVAIN bezeichnen diese Sorte von Physoden als Lysosomen. In dieser Bezeichnung spiegelt sich die Vermutung wider, daß diese Organelle eine Verdauungsfunktion besitzen.

Um die verwirrende Vielzahl von Bezeichnungen etwas zu vereinfachen, werden in dieser Arbeit die osmiophilen Vesikel ganz allgemein als Cytosomen bezeichnet.

WAGNER und ROSSBACHER (1980) wiesen mit Hilfe der Chlorotetrazyklin-Vitalfärbung und der Röntgenmikroanalyse an fixiertem Material nach, daß Cytosomen hochkonzentriert schwerlösliches Calcium enthalten. Diese Organelle können als Calcium-Speicher angesehen werden, die auch unter äußeren Calcium-Mangelbedingungen die Konzentration an leichtlöslichem Calcium innerhalb der Zelle über lange Zeiten konstant halten. Dieser Mechanismus könnte erklären, daß erst nach mehrtägiger Kultur in Calcium-freiem Medium die Schwachlichtbewegung des Chloroplasten gehemmt wird (WAGNER und KLEIN 1978). STABENAU (1980) findet in Mougeotia-Cytosomen die Enzyme Katalase, Glykolsäure-Oxidase, Hydroxypyruvat-Reduktase und Malat-Dehydrogenase. Er vergleicht sie in ihrer Funktion mit Blatt-Peroxisomen bzw. Microbodies aus Spirogyra (STABENAU 1976). Ferner kann er auch Organelle nachweisen, "die nicht mit den Microbodies identisch sind" und je nach Kulturbedingung mitochondrienähnliche Strukturen aufweisen oder sich als "sehr kleine vesikelähnliche Partikel mit einem Durchmesser von ca. 0,1 μm darstellen." Diese Organelle enthalten ebenfalls peroxisomale Enzyme mit Ausnahme von Glykolsäure-Oxidase.

Neben den osmiophilen, ovalen Cytosomen existieren noch, wenn auch in wesentlich geringerer Anzahl, homogen graue, runde Vesikel. Ihr Inhalt und ihre Funktion sind unbekannt.

Die Zellmorphologie von Mougeotia wird durch verschiedene Fixantien und Fixierungspuffer unterschiedlich beeinflusst. Es wurde empirisch ermittelt, welche Fixierlösungen den besten Erfolg bei Mougeotia zeigen, jedoch läßt sich die unterschiedliche Wirkung der angewandten Methoden nicht hinreichend begründen und soll deshalb nicht weiter diskutiert werden.

Von den Substanzen, die benutzt wurden, um die Darstellung der Mikrofilamente zu optimieren, haben lediglich die Gerbstoffe und NEM auch einen Effekt auf die allgemeine Zellmorphologie.

Unter dem Einfluß von NEM zeigen die Mitochondrien ein verändertes Aussehen (siehe Seite 136). Mit Ausnahme der Mitochondrien und Mikrofilamente wurde keine weitere Beeinflussung von Zellstrukturen durch NEM festgestellt. Im Gegensatz hierzu zeigen die verwendeten Gerbstoffe vielfältige Effekte.

Gerbstoffe dienen in der Elektronenmikroskopie der Kontraststeigerung und der besseren Mikrofilamentdarstellung (SIMIONESCU und SIMIONESCU 1976; LAFOUNTAIN et al. 1977). Die Auswirkungen dieser Substanzen auf die Mikrofilamente von Mougeotia werden auf Seite 135 erörtert.

Wahrscheinlich agieren Gerbstoffe nicht in erster Linie als Fixantien, sondern verbessern die Bleikontrastierung osmiumfixierter Strukturen (SIMIONESCU und SIMIONESCU 1976). Die spezielle Wirkung der Gerbstoffe auf Mikrofilamente kann durch eine Anlagerung an die Filamente erklärt werden, wodurch diese gegen OsO_4 besser geschützt werden (POLLARD und MAUPIN 1978).

Gerbstoffe erzielen bei Mougeotia nicht den erhofften Erfolg. Es fiel zwar eine deutliche Kontraststeigerung auf, aber das Cytoplasma wurde extrahiert oder verklumpte. Bei einigen Fixierungen mit Gerbstoffen wurde der Tonoplast nicht durchgehend dargestellt.

Die besten Resultate ergab ein Zusatz von Tannin zur Nachfixierung. Mit dieser Methode wurden die Membranen als Doppellinie mit Zwischenraum dargestellt. Es fällt auf, daß der Tonoplast kontrastreicher als das Plasmalemma erscheint. Dies deutet auf physiologische Unterschiede zwischen beiden Membranen. Auch das Cytoplasma wird mit dieser Methode noch befriedigend fixiert.

Gallussäure anstelle von Tannin bei der Nachfixierung führt ebenfalls zu einer guten Erhaltung von Membranen, jedoch zu einer nahezu vollständigen Extraktion des Grundcytoplasmas.

Bei beiden Methoden ist jedoch der Chloroplast recht gut erhalten.

Zusatz von Gerbstoffen zur Simultanfixierung ergibt schlechte Resultate. Wahrscheinlich reduzieren die Gerbstoffe bereits das in der Fixierlösung vorhandene Osmiumtetroxid. Dies führt zu einer Schwarzfärbung des Mediums. Auf diese Weise gelangt wahrscheinlich nicht genug Osmiumtetroxid in die Zelle um eine ausreichende Fixierung zu erzielen. Außerdem können undefinierte Reaktionsprodukte entstehen, die die Strukturhaltung negativ beeinflussen. Völliges Weglassen des Osmiumtetroxids aus der gerbstoffhaltigen Fixierlösung verbessert die Strukturhaltung auch nicht; dies stimmt mit der Tatsache überein, daß alle in dieser Arbeit verwendeten reinen Glutaraldehydfixierungen schlechtere Resultate brachten als Simultanfixierungen.

4.02. Mikrofilamente und ihre Darstellung bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden

Mit Ausnahme von fibrillösen Strukturen innerhalb eines Plasmastranges konnten weder FOOS noch PUISEUX-DAO und LEVAIN elektronenmikroskopisch Mikrofilamente finden, wie sie aufgrund physiologischer Experimente unter Verwendung von PCMB und Cytochalasin B seit langem für die Plastidenbewegung von Mougeotia gefordert wurden. Dieses bisherige Scheitern eines gesicherten elektronenoptischen Nachweises erscheint verständlich, nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß es sich bei den Mikrofilamenten um Aktin handelt, das bekanntlich äußerst fixierungs-labil ist.

Obwohl Aktin mengenmäßig einen hohen Anteil am Gesamtproteingehalt der eukaryonten Zellen ausmacht, nämlich 10 - 20 % (WOHLFARTH-BOTTERMANN 1977), zeigen sich auch bei anderen Objekten häufig Schwierigkeiten, intrazelluläre Mikrofilamente nach Fixierung und Einbettung noch gut zu erhalten und in größerer Menge zu finden. Dies liegt in erster Linie am schädigenden Einfluß der Fixiermittel, insbesondere von Osmiumtetroxid.

MAUPIN-SZAMIER und POLLARD (1978) stellten Untersuchungen zur Stabilität von Aktinfilamenten an, um Fixierungsmethoden zu entwickeln, die eine bessere Erhaltung von Aktinfilamenten erzielen. Sie isolierten F-Aktin und maßen über die Viskositätsänderung der aktinhaltigen Lösung den Depolymerisationsgrad der Aktinfilamente unter verschiedenen Bedingungen. Besonderen Wert legten sie auf den Einfluß von Osmiumtetroxid; darüber hinaus untersuchten sie die Auswirkungen der Temperatur, der Pufferzusammensetzung, des pH-Wertes, der Vorfixierung und der Gegenwart von Tropomyosin.

Es zeigte sich, daß die Viskosität der F-Aktin-Lösung bei Inkubation mit OsO_4 in einem biphasigen Zeitverlauf abfällt. Nach einer anfänglichen Verzögerungsphase, in der

die Viskosität nur wenig abfällt, folgt ein rascher Abfall erster Reaktionsordnung. Dies bedeutet, daß die Aktinfilamente anfangs relativ stabil sind und dann, je nach Versuchsbedingung, rasch depolymerisieren. Die Anlaufphase ist umso größer, je geringer die Konzentration an freiem OsO_4 ist, und sie wird durch niedrige Temperatur verlängert. Cacodylat- und besonders Collidinpuffer führen zu einer schnelleren Zerstörung der Aktinfilamente, während sich Natriumphosphatpuffer günstig auswirkt. Neutrale oder leicht saure pH-Werte verlängern die Verzögerungsphase. Eine Vorbehandlung mit Glutaraldehyd führt zwar zu einer kovalenten Vernetzung der Aktinmoleküle, schützt aber dennoch die Aktinfilamente nicht vor einer nachfolgenden Inkubation in OsO_4 -haltiger Lösung.

MAUPIN-SZAMIER und POLLARD zeigten, daß die Ergebnisse, die sie mit Aktin-haltigen Lösungen erzielt hatten, recht gut auf die Strukturhaltung von Aktinfilamenten nach Fixierung, Dehydratation und Einbettung übertragen werden können. Es stellte sich heraus, daß Variationen bei der Vorfixierung mit Glutaraldehyd kaum Einfluß auf die Strukturhaltung der Filamente haben. MAUPIN-SZAMIER und POLLARD erreichten die besten Resultate mit einer 20minütigen Fixierung bei 0°C in Natriumphosphatpuffer bei sehr geringer OsO_4 -Konzentration.

Die Ergebnisse dieser Arbeit mit intrazellulären Mikrofilamenten zeigen die gleiche Tendenz wie die Resultate von MAUPIN-SZAMIER und POLLARD.

Vorfixierungen mit Glutaraldehyd oder Acrolein als einzigem Fixans ergaben für Mougeotia nicht nur im Hinblick auf die Mikrofilamente, sondern auch auf die Erhaltung der gesamten Zelle mäßige bis schlechte Ergebnisse. Bei der Verwendung von Acrolein allein wurde z.B. außerordentlich viel Chlorophyll während der gesamten Präparation extrahiert. Dies läßt darauf schließen, daß die Membranen der Zellorganelle schlecht fixiert wurden.

Deshalb wurde auf eine Simultanfixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid zurückgegriffen. Man muß bei dieser Fixierungsmethode davon ausgehen, daß Osmiumtetroxid vor Glutaraldehyd in die Zelle eindringt (LANGENBERG 1978). Ähnliches berichten TAKAHASHI, SUZUKI und YAMAMOTO (1978) von einer Formaldehyd-(Glutaraldehyd)-Osmiumtetroxid-Simultanfixierung. Da, wie oben erwähnt, Glutaraldehyd selbst als einziges Vorfixans Mikrofilamente nicht vor einer nachfolgenden OsO_4 -Behandlung schützen kann, ist die unterschiedliche Eindringgeschwindigkeit beider Substanzen anscheinend nur von geringer Bedeutung.

Kalium-Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (50 mM) führt zu einer sehr schlechten Erhaltung von Aktinfilamenten und Cytoplasma bei Mougeotia. Cacodylatpuffer bewirkt eine mäßige Erhaltung der Filamente, während Collidinpuffer anscheinend stark depolymerisierend wirkt, so daß nur noch Filamentbruchstücke übrig bleiben. Bei den Versuchen von MAUPIN-SZAMIER und POLLARD förderte Collidin (50 mM; pH = 7) sehr stark die Depolymerisation der Filamente; Cacodylatpuffer erwies sich als etwas günstiger, während Natrium-Phosphat-Puffer im Gegensatz zu meinen Kalium-Phosphat-Resultaten recht gute Ergebnisse brachte.

Neben diesen in der Elektronenmikroskopie üblichen Puffern wurde auch das niederosmolare Kulturmedium MXS als Fixierungspuffer verwendet. Es führt zu einer guten Strukturhaltung der Gesamtzelle wie auch der Mikrofilamente. MXS ist insofern günstig, als die Algen bereits durch die Vorkultur an dieses Medium adaptiert sind. Infolge seiner geringen Osmolarität kommt es nicht zu einer Ablösung des Cytoplasmaschlauches. Der pH-Wert von 6, der anfangs als Nachteil angesehen wurde, erweist sich im nachhinein als besonders günstig zur Mikrofilamenthaltung. Und anscheinend führt der gering konzentrierte Phosphatpuffer in der MXS-Lösung in Übereinstimmung mit Ergebnissen von MAUPIN-SZAMIER und POLARD zu besserer Filamenthaltung als der 50mmolare Kalium-Phosphatpuffer nach SÖRENSEN.

Aufgrund der oben erwähnten Vorzüge wurde deshalb eine OsO_4 -Glutaraldehydsimultanfixierung mit MXS als Fixierungspuffer in dieser Arbeit am häufigsten verwendet.

Die Fixierungen erfolgten durchwegs auf Eis; die Temperatur in der Fixierlösung betrug $0^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$. Lediglich eine einzige Fixierung wurde bei Zimmertemperatur ausgeführt. Hierbei ergibt sich die Schwierigkeit, daß Osmiumtetroxid bei Zimmertemperatur rasch reduziert wird. Dieser Vorgang ist an der Braunfärbung der Lösung erkennbar. Die Mikrofilamente werden, wie nach den Ergebnissen von MAUPIN-SZAMIER und POLLARD zu erwarten, unter diesen Versuchsbedingungen schlecht erhalten.

Im Hinblick auf die hinreichend bekannte zerstörerische Wirkung von Osmiumtetroxid auf Aktinfilamente erscheint es erstaunlich, daß dennoch bei einigen Zell-Systemen nach intensiver OsO_4 -Fixierung gestreckte Filamente erhalten blieben (POLLARD und MAUPIN 1978). MAUPIN-SZAMIER und POLLARD erklären dies durch die protektive Wirkung von assoziierten Proteinen, da bei ihren Versuchen mit isolierten Aktinfilamenten diese durch Anlagerung von Tropomyosin gegen eine nachfolgende Behandlung mit OsO_4 geschützt werden. Auch bei Fixierungen von Muskelgewebe zeigt Tropomyosin diesen positiven Effekt. Ebenfalls kann appliziertes HMM, das sich an Aktinfilamente anlagert, einen schädigenden Einfluß von OsO_4 verhindern. So tritt z.B. auch bei *Nitella* eine verstärkte Erhaltung von Mikrofilamenten in der Gegenwart von gebundenem HMM auf (PALEVITZ und HEPLER 1975). Ebenso können Tannine im Fixiermedium die Strukturhaltung der Mikrofilamente verbessern, wie dies z.B. bei *Acanthamoeba castellanii* der Fall ist (BEGG et al. 1978).

MAUPIN-SZAMIER und POLLARD empfehlen deshalb, vor der Fixierung die Objekte in HMM bzw. Tropomyosin zu inkubieren, oder alternativ, wegen seines besseren Eindring-

vermögens, Tannin zu verwenden. So erreicht man, daß diese Substanzen an Aktin binden und es vor der nachfolgenden OsO_4 -Behandlung schützen können. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit Gallussäure, Tannin, Phalloidin und NEM eingesetzt, die alle an Aktomyosine binden.

Die zweifelsfrei beste protektive Wirkung bei Mougeotia besitzt Phalloidin. Es ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes Amanitas phalloides. Im tierischen und menschlichen Organismus entfaltet dieses Oligopeptid seine Giftwirkung in den Leberzellen, deren Membranen es leicht durchdringt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (LENGSFELD et al. 1974; WIELAND 1976) zeigen, daß nach Einwirkung dieses Toxins in der auf das Doppelte angeschwellenen Leberzelle viele aus Aktin aufgebaute Mikrofilamente nachgewiesen werden können.

Diese Entdeckung führte zu weiteren Untersuchungen über die Wirkungsbeziehung zwischen Phalloidin und isoliertem Aktin. Phalloidin bindet an F-Aktin, nicht jedoch an G-Aktin (WIELAND 1976; WIELAND 1977; FAULSTICH, SCHÄFER und WECKAUF 1977; DE VRIES und WIELAND 1978). Es verschiebt das Gleichgewicht von G-Aktin nach F-Aktin und stabilisiert das Aktinfilament gegen so vielfältige depolymerisierende Einflüsse wie KJ, DNAase, Hitzedenaturierung, Ultraschall, niedrigen pH-Wert und Cytochalasin B. Der antagonistische Effekt von Cytochalasin B und Phalloidin läßt sich auch an den Ergebnissen von BLATT et al. (1980) bei Vaucheria zeigen. Die Filament-stabilisierende Wirkung von Phalloidin kann recht gut eingesetzt werden, um intrazelluläre Mikrofilamente während der Fixierung und Einbettung der Objekte zu erhalten.

Bei Mougeotia führt eine geringe Konzentration von Phalloidin im Fixiermedium zu langen, geraden Filamenten, die in großer Zahl auftreten. Ob es sich um eine Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin handelt, oder um eine protektive Wirkung auf die Fibrillen, wurde nicht nachgewiesen. Da das Phalloidin gleichzeitig zusammen mit den Fixiermitteln

einwirkte, kann man eher einen Schutzeffekt voraussetzen. Die mit Phalloidin inkubierten Zellen zeigen nie anstelle gestreckter Fibrillen Filamentnetzwerke oder gar gries-ähnliche Strukturen. Soweit solche Strukturen bei Phalloidin-freien Fixierungen auftreten, dürfte es sich um Abbauprodukte von Fibrillen handeln, nicht jedoch um den lebensnahen Zustand.

Es stellt sich die Frage, ob Phalloidin die Mikrofilamente innerhalb der Zelle genau dort aufbaut bzw. stabilisiert, wo sie in vivo auftreten. Vergleicht man mit Phalloidin behandelte Zellen mit Kontrollzellen, so stellt man lediglich einen Unterschied in der Menge an Fibrillen fest, ohne daß eine Veränderung im Verteilungsmuster auffallen würde. Dies stimmt mit den Ergebnissen von STOCKEM et al. (1978) und WEHLAND et al. (1978) überein. Auch sie fanden Phalloidin-induzierte Mikrofilamente in großer Anzahl bei *Physarum polycephalum* und *Amoeba proteus* dort, wo sie auch in Kontrollzellen unter guten Fixierungsbedingungen, wenn auch in geringerer Menge, nachgewiesen werden konnten. STOCKEM, WEBER und WEHLAND schließen deshalb, daß die Phalloidin-induzierten Mikrofilamente nicht zufällig verteilt auftreten, sondern eher dort, wo sie unter natürlichen Bedingungen permanent vorhanden sind oder wo die Zelle sie vorübergehend formt.

Im Gegensatz zu den ermutigenden Resultaten mit Phalloidin führte der Zusatz von Tannin oder Gallussäure zur Vor- bzw. Nachfixierung zu keiner besseren Strukturhaltung der Filamente. Nach den Ergebnissen von LAFOUNTAIN et al. (1977) und der Arbeit von MAUPIN-SZAMIER und POLLARD (1978) wäre ein günstiger Effekt zu erwarten gewesen.

Immerhin wurden die Aktinfilamente weniger leicht extrahiert als in Kontrollfixierungen. Somit blieben bei der Verwendung von Gerbstoffen mehr Fibrillen erhalten, wenn

auch die einzelnen Filamente schlecht fixiert wurden. Der mäßige Erfolg dieser Substanzgruppe kann eventuell dadurch bedingt sein, daß in Agar-Agar eingebettete Algen für diese Versuche verwendet wurden. Dadurch dringen Fixiermittel langsamer in die Zelle ein. Dies erschwert eine artefaktfreie Fixierung.

Die verminderte Extraktion von Fibrillen, sowie die verbesserte Membrandarstellung (siehe Seite 66), lassen weitere Experimente mit Gerbstoff-haltigen Fixierungen trotzdem als sinnvoll erscheinen.

Eine weitere physiologisch aktive Substanz, die die Erhaltung von Mikrofilamenten beeinflusst, ist N-Äthylmaleimid, NEM. Es lagert sich an Myosin bzw. HMM an (YAMAGUCHI et al. 1973; MEEUSEN und CANDE 1979), ohne die Bindung von Myosin an Aktin zu behindern. Da es jedoch die F-Aktin-aktivierte Myosin-ATPase irreversibel hemmt (CHEN und KAMIYA 1975), kann es die Interaktion von Aktomyosin in vitro und in vivo unterbinden. So wiesen z.B. MEEUSEN und CANDE 1979 nach, daß mit NEM behandeltes HMM die Superpräzipitation von isoliertem Aktin und die Kontraktilität von isoliertem Cytoplasma von *Chaos carolensis* behindert. Bei *Nitella* unterbindet NEM die Cytoplasmaströmung, indem es die Myosin-ATPase blockiert (CHEN und KAMIYA 1975).

Neben seiner Wirkung auf das Aktomyosin-System beeinflusst es die mikrosomale Na^+/K^+ ATPase und den K^+ -Influx in die Mitochondrien (HARRIS und STAHL 1976; DIWAN und LEHRER 1977; DIWAN et al. 1977).

Da NEM die Chloroplastenorientierung bei *Mougeotia* hemmt, wurde es eingesetzt, um vor Fixierungsbeginn die licht-induzierte Chloroplastenbewegung anzuhalten. Dahinter steht die Überlegung, daß Filamente, die durch NEM in ihrer Aktivität gestoppt wurden, möglicherweise eine bessere Strukturhaltung zeigen. Tatsächlich findet man nach NEM-Behandlung mehr und gleichzeitig längere Filamente. Diese Filamenten sind aber häufig nicht gerade ausgerichtet, wie etwa nach Phalloidin-Behandlung, sondern locker verschlungen.

4.03. Beziehungen der Mikrofilamente zum Bewegungs- apparat

Erst nach Kenntnis der unterschiedlichen Erhaltung und Darstellung von Filamenten unter verschiedenen Fixierungsbedingungen erschien es sinnvoll, die Verteilung der Mikrofilamente innerhalb der Zelle und ihre eventuelle Veränderung während der Bewegung zu untersuchen. Dies wiederum ist wichtig, um Information über den möglichen Bewegungsmechanismus zu erhalten.

Aktin ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42000 d. Das monomere Aktin, das sogenannte G-Aktin, polymerisiert bei geeignetem Ionenmilieu zu einer doppelsträngigen Helix. Diese Helix ist polar gebaut; die Anlagerung weiterer Monomere geschieht nur in einer Richtung. Die funktionsfähige Form, die mit Myosin interagieren kann, ist das F-Aktin (siehe WAGNER 1979).

Prinzipiell kann das Aktin in der Mougeotia-Zelle entweder ständig als filamentöses Aktin im funktionsfähigen Zustand vorliegen oder es kann bei Bedarf von G-Aktin zu F-Aktin polymerisieren. Für beide Verfahrensweisen können bereits gut untersuchte Objekte angeführt werden, z.B. die Characeen-Grünalgen mit ihrer Rotationsströmung oder der Schleimpilz Physarum polycephalum mit seiner Pendelströmung.

In der Characeen-Internodialzelle fließt dünnflüssiges Endoplasma entlang des stationären Ektoplasmas. Aufgrund des Geschwindigkeitsprofils und theoretischer Modellüberlegungen (siehe HAUPT 1977) konnte man vorhersagen, daß an der Grenze zwischen Ekto- und Endoplasma Scherkräfte auftreten und dort die triebkraft-erzeugenden Strukturen vorhanden sind. Stationäre Aktinfibrillen sind im Ektoplasma verankert (NAGAI und HAYAMA 1979). Das Endoplasma enthält das Myosin (CHEN und KAMIYA 1975), das durch Interaktion mit dem F-Aktin

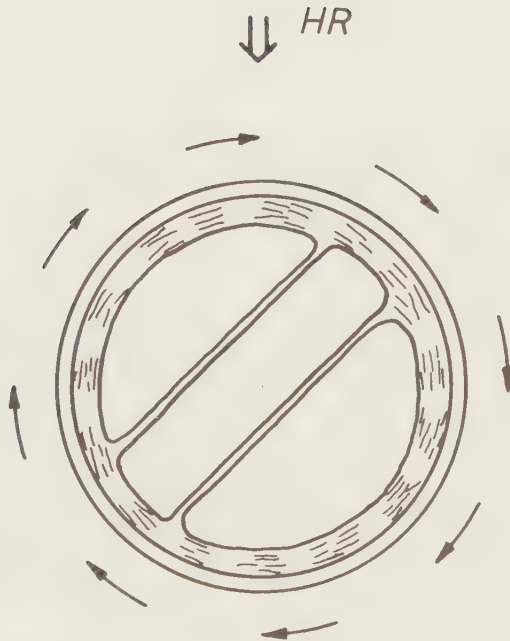
die Bewegung erzeugt. Da die Endoplasmaströmung bis zum Zelltod gleichförmig und ununterbrochen verläuft, wäre ein Abbau der Fibrillen funktionell nicht naheliegend.

Bei *Physarum polycephalum* dagegen strömt das Endoplasma mit periodisch wechselnder Richtung in den Ektoplasmaröhren. Als triebkrafterzeugende Strukturen für diese Pendelströmung lassen sich im Ektoplasma Aktinfibrillen nachweisen. Kontraktion der Fibrillen in einem Gebiet der Ader führen zu einer Druckerhöhung; das Endoplasma fließt zum Ort niederen Druckes, also von der Kontraktionsstelle weg. Der Massentransport bei *Physarum* wird durch einen Druckflußmechanismus bewirkt. Durch die Änderung in der Strömungsrichtung müssen auch die kontrahierenden Zonen wechseln und dies ist mit einem ständigen Auf- und Abbau von Aktinfibrillen verbunden. Das heißt, es findet ein ständiger Wechsel zwischen G- und F-Aktin statt (GÖTZ VON OLENHUSEN und WOHLFARTH-BOTTERMANN 1979). Dies beweist auch die Tatsache, daß ein isolierter Endoplasmatropfen von *Physarum polycephalum* innerhalb von 10 Minuten zu Ektoplasma erstarrt, wobei zunehmend Aktinfilamente auftreten (WOHLFARTH-BOTTERMANN und ISENBERG 1976).

Für *Mougeotia* wurde bereits zu Beginn dieser Arbeit das zweite Modell eines Auf- und Abbaus von Aktin aus zwei Gründen favorisiert.

Zum einen handelt es sich bei *Mougeotia* im Gegensatz zu *Nitella* und *Chara* um eine zeitlich begrenzte Bewegung, die durch Belichtung induziert wird und nach ungefähr 40 Minuten im Dunkeln beendet ist. Es ist schwer einzusehen, warum in der *Mougeotia*-Zelle das F-Aktin auch in der Bewegungspause in seiner betriebsbereiten Form aufrechterhalten werden soll, wenn es doch so leicht depolymerisiert werden kann, damit leichter transportabel ist und auch sehr schnell bei Bedarf wieder aufgebaut werden kann.

Hypothese 1:



Schematischer Querschnitt durch eine Mougeotia-Zelle mit Chloroplast, Vakuole und corticalem sowie plastidärem Cytoplasma.

Im gesamten corticalen Cytoplasma einschließlich des Bereiches, der an die Plastidenkante angrenzt, liegen Mikrofilamente, die zu Fibrillen gebündelt sind. Die Pfeile sollen eine postulierte, einheitliche Polarität der Filamente darstellen.

Zum zweiten läßt die lange Dauer der Bewegung genügend Zeit für einen solchen Auf- und Abbau. Beim Endoplasmatropfen von *Physarum polycephalum* kann die Fibrillogenese sogar innerhalb von 35 Sekunden geschehen (ISENBERG und WOHLFARTH-BOTTERMANN 1976); so daß 40 Minuten mehr als genug für Polymerisation und Kontraktion der Fibrillen bei *Mougeotia* erscheinen.

Zusätzlich zu dem Problem, ob Aktin ständig in polymerer Form vorliegt oder auf- und abgebaut wird, kann man für die Chloroplastenbewegung bei *Mougeotia* zwei prinzipiell unterschiedliche Bewegungsmechanismen postulieren.

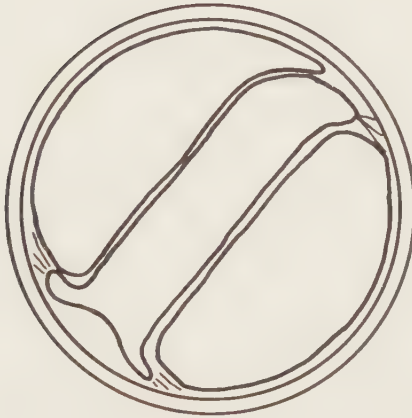
Es könnte sich im corticalen Cytoplasma um die Zelle herum ein Ring von eng nebeneinanderliegenden Aktinfibrillen befinden. Deren Filamente werden durch die Induktionsbelichtung entweder über eine Polymerisation neu aufgebaut oder aber sie sind bereits vorhanden und werden lediglich in ihrer Funktionsfähigkeit aktiviert. Postuliert man, daß an der äußeren Plastidenmembran sich Myosin befindet, so könnte der Chloroplast sich an diesen Filamentbündeln entlang bewegen. Diese Vorstellung wurde durch die Verhältnisse in der Characeen-Internodialzelle inspiriert.

Die Richtung, in die sich der Plastid dreht, ist nach dieser Hypothese durch die Polarität der Fibrillen vorherbestimmt. Sie sollte ringsum einheitlich sein, um zu garantieren, daß die Kanten sich synchron in die gleiche Richtung bewegen. Auf diese Weise kann der Plastid ohne Schwierigkeit seine gesamte Breitfläche dem einfallenden Licht zuwenden.

Allerdings kann man an *Mougeotia*-Zellen gelegentlich lichtmikroskopisch beobachten, daß sich die Kanten asynchron aufeinander zubewegen. Das bedeutet, daß sich Ober- und Unterkante zur gleichen Seite drehen. Meist übernimmt dann nach kurzer Zeit eine Kante die Führung, während die andere in ihre "richtige" Stellung

Hypothese II:

⇓ HR



Schematischer Querschnitt durch eine Mougeotia-Zelle mit Chloroplast, Vakuole und corticalem sowie plastidärem Cytoplasma.

Im Übergangsbereich des corticalen zum plastidären Cytoplasma liegen aus Mikrofilamenten aufgebaute Fibrillen, die am Chloroplasten inserieren. Die Plastidenkante wird in Lappen aufgespalten.

gezogen wird. Dies könnte auf eine uneinheitliche Polarität der Aktinfilamente oder "auf eine Ungleichverteilung des Phytochroms in der Zelle" (WACHTER 1979) zurückzuführen sein.

Die zweite Hypothese basiert auf der Überlegung, daß in unmittelbarer Nähe der Plastidenkante einzelne Fibrillen Kontakt zum Chloroplasten erhalten. Einerseits könnten Aktinfilamente durchgehend von der Plastidenmembran zum Plasmalemma ziehen. Andererseits ist es möglich, daß Mikrofilamente jeweils mit einem Ende am Plasmalemma oder an der Plastidenkante verankert sind, während das andere Filamentende frei ist. Setzt man voraus, daß die Filamente, die vom Plastiden bzw. vom Plasmalemma ausgehen, unterschiedliche Polarität besitzen und postuliert man ferner, daß Myosinfilamente nebeneinanderliegende Aktinfilamente verknüpfen, so könnten diese Filamente nach dem Gleitmechanismus aneinander vorbei bewegt werden (siehe SPUDICH 1974). Es käme zu einer Verkürzung der kontraktilen Einheit und der Plastid würde auf diese Weise eine kleine Strecke weit bewegt. Anschließend werden nach dieser Hypothese die Filamente wieder abgebaut.

Durch eine Wiederholung dieses Vorganges kann der Chloroplast in seine Endstellung gelangen.

Inserieren zwei Filamentbündel an der rechten und linken Kante des Plastiden, so müßte dieser aufgrund der entgegengesetzt an ihm wirkenden Kräfte auseinandergezogen werden. Dies kann tatsächlich auch beobachtet werden, wie Abb. 1b und Abb. 4' beweisen.

In beiden Modellen ist Myosin für die Bewegung nötig. Die Existenz von Myosin in der Mougeotia-Zelle wird durch die Ergebnisse mit NEM nahegelegt. NEM ist ein potenter und irreversibler Inhibitor der F-Aktin-aktivierten Myosin-ATPase, mit dessen Hilfe CHEN und KAMIYA 1975 nachweisen konnten, daß sich bei der Internodial-

zelle von *Nitella* das Myosin im strömenden Endoplasma befindet. Mit NEM behandeltes HMM bindet an Aktin und verbleibt sogar in der Anwesenheit von MgATP im Rigorzustand (MEEUSEN und CANDE 1979). Bei *Mougeotia* vermindert NEM konzentrationsabhängig zwischen 2,5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ die Plastidenbewegung.

In Nicht-Muskelzellen ist die Myosin-Konzentration meist sehr gering; Aktin liegt im annähernd hundertfachen molaren Überschuss vor (POLLARD 1975). Darüberhinaus ist Myosin noch fixierungslabiler als Aktin es ohnehin ist (SMALL 1974). Deshalb wurde in dieser Arbeit kein elektronenoptischer Nachweis von Myosin versucht. Nach Hypothese II lägen Myosinfilamente zwischen den Aktinfilamenten. Nach Hypothese I träte Myosin in niederpolymerer Form auf und wäre dadurch ohnehin nicht elektronenmikroskopisch zu identifizieren. Diese Überlegungen berechtigen daher nicht zur Bevorzugung einer der beiden Hypothesen.

Die sonstigen Ergebnisse sprechen für das zweite Modell. Die Evidenzen, die dieser Schlußfolgerung zugrunde liegen, sind die räumliche und zeitliche Filamentverteilung und die Veränderung der Plastidenform während der Bewegung. Dies soll im folgenden erläutert werden.

Es wird in dieser Arbeit stets das Cytoplasma in drei Bereiche unterteilt: das plastidäre, das corticale Cytoplasma und der sogenannte Übergangsbereich. Hiermit ist das Cytoplasma gemeint, welches Kontakt mit der Plastidenkante hat und an seinem Rande in das plastidäre bzw. corticale Cytoplasma übergeht.

Nach der ersten Hypothese sollten im gesamten, der Wand anliegenden Cytoplasmasaum die Filamente gleich häufig auftreten. Der Cytoplasmabereich, der jeweils Kontakt mit der Plastidenkante hat, dürfte sich in der Filamentverteilung nicht vom restlichen wandständigen Cytoplasma (corticalem Cytoplasma) unterscheiden.

Außerdem ist es nach der ersten Hypothese nicht unbedingt erforderlich, daß der Fibrillen-Ring zu Bewegungsbeginn auf- und zu Bewegungsende wieder abgebaut wird. Man könnte sich auch vorstellen, daß durch die Induktionsbelichtung die kontraktile Einheiten lediglich aktiviert werden.

Dagegen ist nach der zweiten Hypothese die Plastidendrehung nur denkbar, wenn während der Bewegung ständig neue Fibrillen in der Nähe der Plastidenkante aufgebaut werden.

Zur Überprüfung der Filamentverteilung wurde die Fläche der Filamentbündel, die pro Schnitt jeweils getroffen waren, gemessen. Dies wurde als Maß für die Menge an Filamenten gewertet. Es zeigt sich, daß bei *Mougeotia* zu Beginn der Bewegung die Menge an nachweisbaren Mikrofilamenten ansteigt und zum Ende der Bewegung abfällt. Leider wurde die Menge an Filamenten zum Zeitpunkt der Bewegungsinduktion bei den zwei ausgewerteten Fixierungen nicht erfaßt. Aber andere, für diese Arbeit ausgeführte, Fixierungen ergaben, daß *Mougeotia*-Zellen nach erfolgtem Richten auf Kante, also vor Bewegungsinduktion, nur spärlich Mikrofilamente aufweisen. Der Anstieg an nachweisbaren Filamenten ist bei Fixierung A (s. Seite 86) wesentlich kleiner als bei Fixierung B (s. Seite 88). Dies könnte dadurch bedingt sein, daß Filamente zu Beginn der Bewegung durch den Fixierungsvorgang besonders leicht extrahiert werden. Stoppt man die Bewegung vor Fixierungsbeginn mit NEM (Fixierung B), so verhindert dies vielleicht den hohen fixierungsbedingten Verlust an Filamenten.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe schließen ein ständiges Verharren des Aktins in der filamentösen Form aus.

Wie sind nun die Mikrofilamente in den drei verschiedenen Cytoplasmabezirken verteilt?

Die Filamente liegen überproportional häufig im Übergangsbereich, wo sie zu Beginn der Bewegung verstärkt sichtbar und am Ende wieder abgebaut werden.

Das corticale Cytoplasma besitzt zwar eine größere Menge an Filamenten. Aber wegen seiner größeren Ausdehnung muß man korrekterweise die Menge an Filamenten auf die Cytoplasma-Länge beziehen, d.h. die Dichte bestimmen. Es zeigt sich, daß das corticale Cytoplasma eine geringere Dichte an Filamenten aufweist als der Übergangsbereich. Zu Beginn der Bewegung steigt die Dichte an und fällt zu Bewegungsende wieder ab.

Im plastidären Cytoplasma treten Mikrofilamente sowohl in ihrer Menge als auch in ihrer Dichte spärlicher auf als in den zwei anderen Cytoplasmabereichen. Auch ist im plastidären Cytoplasma der Anstieg und Abfall der Dichte an Filamenten während der Bewegung wesentlich schwächer ausgeprägt.

Die Tatsache, daß der Übergangsbereich die höchste Dichte an Mikrofilamenten besitzt und dort auch der Anstieg und Abfall am stärksten ausgeprägt ist, spricht für die Wichtigkeit dieses Bereiches. Bereits 1962 schloß ZURZYCKI auf die Existenz von "short range forces" in enger Nähe der Plastidenkante.

Der Vergleich der Plastidenform vor und während der Bewegung gibt vielleicht einen Hinweis auf die Kräfte, die am Plastiden in der Bewegungsphase einwirken.

Nach dem Richten auf Kante und ebenfalls nach ausgeführter Schwachlichtbewegung liegt der Chloroplast glatt ausgerichtet im Zellumen. Er besitzt keine oder nur schwach ausgeprägte lappenartige Fortsätze an seiner Kante. Der Chloroplast ist im allgemeinen nicht verwunden und in seinem Durchmesser überall annähernd gleich dick.

Diese Form verändert sich nun meist sehr stark in der Bewegungsphase. Häufig dreht eine Kante bereits an, während die andere sich noch in der Ausgangsstellung befindet. Dadurch kommt es zu einer Krümmung des Plastiden; aber auch im weiteren Ablauf der Bewegung kann er sich auf vielfältige Weise verdrillen, krümmen und seinen Durchmesser verändern. Dies läßt darauf schließen, daß der Chloroplast äußerst leicht verformbar ist.

Für die Diskussion über den Bewegungsmechanismus ist es besonders interessant, daß die Kante des Plastiden sich häufig in Lappen aufspaltet. Oft sind es ein bis zwei Fortsätze, im Extremfall aber auch drei (siehe Abb. 47). WACHTER (1979) konnte ebenfalls lichtmikroskopisch Ausbuchtungen beobachten. Es ist leicht vorstellbar, daß durch die Zugkraft inserierender Fibrillen die Kante in Lappen ausgebuchtet wird.

Durch den Abbau der Filamente am Bewegungsende kann die Plastidenkante wieder ihre "normale", schmale Form annehmen. Gelegentlich bleibt die Kante jedoch auch in ihrer zerlappten Form. Vielleicht werden in diesem Fall die Fibrillen nicht vollständig abgebaut. Bei einer erneuten Bewegung, bei der bereits zu Beginn lappenartige Fortsätze existieren, führt der Chloroplast "dabei die Drehbewegung immer in die Richtung aus, in die der größte Fortsatz zeigt. Die Drehung beginnt stets durch Ausbreitung der Fortsätze. Der kompakte Mittelteil wird mehr oder weniger passiv mitgezogen" (WACHTER 1979).

Das gehäufte Auftreten von Fibrillen in der Nähe der Plastidenkante und die mechanische Verformung der Kante sprechen für die zweite Hypothese zur Kraftentwicklung beim Bewegungsablauf.

4.04. Steuerung der Chloroplastenbewegung

Bei dem Versuch, den Bewegungsmechanismus des Mougeotia-Plastiden aufzuklären, drängt sich auch die Frage nach der Steuerung der Bewegung auf.

Calcium könnte der Signalwandler zwischen Lichtperzeption und Bewegungsmechanik sein. Diese Funktion setzt voraus, daß die cytoplasmatische Calcium-Konzentration belichtungsabhängig reguliert wird und daß Calcium quasi der "Ein- und Ausschalter" der Fibrillen ist. Dafür spricht die Tatsache, daß das Aktomyosinsystem des quergestreiften Muskels (siehe SZENT-GYÖRGYI 1975) und des glatten Muskels (ADELSTEIN et al. 1977) ebenso durch Calcium gesteuert wird, wie in vielen Nichtmuskelzellen, z.B. bei Amoeba proteus und Chaos chaos (REINOLD und STOCKEM 1972; STOCKEM und KLEIN 1979), bei Dictyostelium discoideum (MASON et al. 1971) und Physarum polycephalum (DIERKES und STOCKEM 1978. Es gibt zwei naheliegende Denkmöglichkeiten für eine lichtabhängige Calciumsteuerung der Chloroplastenbewegung bei Mougeotia. Einerseits könnte die Induktionsbelichtung einen Calcium-Fluß durch das Plasmalemma in die Zelle bewirken. Andererseits ist eine intrazelluläre Kompartimentierung des Calciums möglich, mit einer Freisetzung von Calcium aus diesen Speichern zu Beginn der Bewegung.

DREYER und WEISENSEEL (1979) zeigten durch Autoradiographieversuche, daß nach Hellrotbelichtung Mougeotia gesteigert Calcium aus dem Außenmedium aufnimmt. Es könnte auf diese Weise durch Belichtung der Calcium-Gehalt der Zelle kurzfristig ansteigen.

Durch eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration könnte das Aktomyosinsystem aktiviert werden.

Demgegenüber ist allerdings zu bedenken, daß Zellen in Calcium-freiem Medium unvermindert gut reagieren; erst nach mehrtägiger Kultur in Calcium-freiem Medium sinkt die Reaktionsbereitschaft (WAGNER und KLEIN 1978). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß das zur Bewegung benötigte Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Bei *Physarum polycephalum* z.B. wird die Aktivität der Mikrofilamente durch ein System von Calcium-speichernden Vesikeln kontrolliert (DIERKES und STOCKEM 1978). Es konnte nachgewiesen werden, daß in der *Mougeotia*-Zelle die Menge an wasserlöslichem Calcium deutlich kleiner ist als der Gehalt an schwerlöslichem Calcium (WAGNER und BELLINI 1976; WAGNER und KLEIN 1978). Dieser sinkt nach mehrtägiger Kultur in Calcium-freiem Medium ab, während die Konzentration an leichtlöslichem Calcium konstant bleibt.

Die Bewegungsfähigkeit des Chloroplasten fällt parallel zur Fraktion an schwerlöslichem Calcium ab (WAGNER und KLEIN 1978).

Die Frage, wo diese wichtige Fraktion an gebundenem Calcium in der Zelle vorliegt, deutet sich anhand der Versuche von WAGNER und ROSSBACHER (1980) mit Hilfe der Röntgenmikroanalyse und der Chlorotetrazyklin-Vitalfärbung an. Inkubiert man *Mougeotia*-Zellen unter geeigneten Bedingungen mit Chlorotetrazyklin, einem Calcium-Fluoreszenz-Farbstoff, so erkennt man gelb-fluoreszierende Punkte im Cytoplasma, speziell entlang des Plastiden. Mittels Röntgenstrahlmikroanalyse konnte gezeigt werden, daß die höchste Konzentration an schwerlöslichem Calcium in Cytosomen nachzuweisen ist. Dieser Gehalt an schwerlöslichem Calcium sinkt deutlich bei Calcium-Mangelkultur. Betrachtet man diese Einzelergebnisse gemeinsam, so drängt sich die Vermutung auf, daß die Cytosomen mit ihrem Gehalt an schwerlöslichem Calcium für die Calcium-Steuerung der Chloroplastenbewegung äußerst wichtig sind, indem sie etwa Calcium bei der Induktionsbelichtung in das Cytoplasma abgeben.

Im Zusammenhang hiermit sei erwähnt, daß die Zugabe des Calcium-Ionophors A 23187 (REED und LARDY 1972) zu Calcium-verarmten Zellen in Calcium-freiem Außenmedium die Bewegung signifikant erhöht, wenn auch nicht bis zu den Kontrollwerten (KLEIN 1976). Dies wäre durch eine Freisetzung des restlichen Calciums aus den Calcium-Speichern, den Cytosomen, möglich, da dieser Ionophor bei anderen Systemen intrazelluläres Calcium aus Mitochondrien freisetzt (PRINCE et al. 1973).

Befinden sich nun genügend Calcium-Speicher in dem für die Bewegung wichtigen Kantenbereich?

In diesem Bereich liegen trotz seiner geringen Ausdehnung immerhin 17,5 % aller Cytosomen. Dieser Prozentsatz erhöht sich während der Bewegung auf 34,3 % und fällt zu Bewegungsende wieder auf den Anfangswert ab. Es kommt also während der Bewegung zur Anhäufung von Calcium-haltigen Vesikeln an der Kante.

Darüber hinaus befinden sich die meisten der im plastidären Cytoplasma auftretenden Cytosomen in unmittelbarer Nähe der Kante, während der zentrale Bereich des plastidären Cytoplasmas nur spärlich besetzt ist. In der Nähe der Kante liegen insgesamt vor Beginn der Bewegung 62,3 % der Cytosomen, und 71,8 % während der Bewegung.

Dies bedeutet, daß die Plastidenkante ständig von Calcium-Speichern umgeben ist. Bei einer Freisetzung von Calcium aus den Cytosomen wären die Diffusionswege bis zu den Fibrillen in Kantennähe sehr kurz.

Sind eventuell die Mitochondrien an der Calcium-Versorgung der Plastidenbewegung beteiligt?

Leider konnten die Mitochondrien der Mougeotia-Zelle bei den röntgenmikroanalytischen Untersuchungen von ROSS-BACHER (1978) aufgrund ihrer geringen Größe und ihres geringen Kontrastes nicht auf ihren Ionengehalt hin ausgewertet werden. Die Mougeotia-Zelle besitzt im

allgemeinen weniger Mitochondrien als Cytosomen. Ferner treten die Mitochondrien im Gegensatz zu den Cytosomen nicht gehäuft an der Plastidenkante auf. Selbst falls die Mitochondrien Calcium freisetzen könnten, ist kein direkter Bezug zur Bewegung des Plastiden zu erkennen.

Interessant sind in dieser Hinsicht auch die Versuche mit Amiprophosmethyl (APM). APM ist ein wirkungsvoller in vivo - Hemmstoff von Mikrotubuli in Pflanzenzellen (QUADER et al. 1977). QUADER und FILNER (1980) mutmaßen, daß die Wirkung dieses Herbizids auf die Flagellenverkürzung von *Chlamydomonas reinhardtii* über eine Veränderung des intrazellulären Calcium-Spiegels bewirkt wird.

Bei isolierten Mitochondrien von *Curcubita pepo* und *Zea mays* bewirkt APM eine verminderte Calcium-Aufnahme. Dies ist auf eine erhöhte Calcium-Freisetzung der Mitochondrien zurückzuführen. Dagegen hat dieses Herbizid keinen Einfluß auf eine mikrosomale Fraktion, die hauptsächlich aus Plasmamembran besteht (HERTEL et al. 1980). Übertragen auf in vivo - Verhältnisse würde dies bedeuten, daß der Calcium-Gehalt im Cytosol erhöht wird, jedoch nicht zu solch hohen Werten, die eine Mikrotubuli-Polymerisation in vitro verhindern. Bei physiologischen Konzentrationen von Mg^{++} würde allerdings auch eine geringere Calcium-Konzentration ausreichen, eine Mikrotubuli-Polymerisation zu verhindern (HERTEL et al. 1980).

APM beeinflusst in Konzentrationen von 10^{-6} - 10^{-4} Mol/l die Plastidenorientierung bei *Mougeotia* nicht. Vorausgesetzt, daß APM bei *Mougeotia* die gleiche Wirkung zeigt wie bei *Chlamydomonas reinhardtii*, bei *Zea mays* und bei *Cucurbita pepo*, bedeutet dies, daß die Mitochondrien bei *Mougeotia* nicht an einer Calcium-Regulation der Plastidenorientierung beteiligt sind.

4.05. Protein-Eluation und HMM-Infiltration zur Aktin- Identifizierung in Mougeotiazellen

Ein anerkannter Beweis dafür, daß es sich bei intrazellulären Mikrofilamenten um Aktin handelt, ist die Dekoration mit HMM. Es gibt hierfür prinzipiell zwei Möglichkeiten:

- a) der in situ-Nachweis an konventionell fixiertem und eingebettetem Material
- b) der Nachweis an isoliertem Cytoplasma und Membranbruchstücken (negative staining).

Da MARCHANT 1976 bereits Filamente im Rohextrakt von Mougeotia andeutungsweise mit HMM dekoriert hat, ohne zeigen zu können, ob diese Filamente an der Bewegung beteiligt sind, sollte in dieser Arbeit zunächst eine in situ-Dekoration ausgeführt werden. Mit dieser Methode ergeben sich bei Mougeotia besondere Schwierigkeiten. Die äußere Schleimschicht, die Zellwand und das Plasmalemma behindern das Eindringen des riesigen HMM-Moleküls (Molekulargewicht 350 000 d). Bei tierischen und pflanzlichen Objekten ist es deshalb üblich, durch Vorbehandlung mit glycerinhaltigen Lösungen die Membran permeabler zu machen und lösliche Zellbestandteile und eventuell sogar intrazellulär vorhandenes Myosin zu entfernen (siehe z.B. RINALDI et al. 1975; ACHTERRATH 1969). Diese Methode kann sehr gut bei robusten, stark plasmahaltigen Objekten wie Physarum polycephalum verwendet werden. Bei Mougeotia jedoch mit der riesigen Vakuole und dem dünnen Cytoplasmaschlauch führt die Glycerinierung zur völligen Zerstörung der Zellstruktur. Dennoch lassen sich bei dieser Methode noch Filamente mit ca. 6 nm erkennen. Bei milderer Glycerinierungsmethoden bleibt die Zellstruktur besser erhalten. Trotzdem ist keine Dekoration der Filamente feststellbar. Die Tatsache jedoch, daß sie die Glycerinierung überstehen, spricht dafür, daß es sich bei ihnen um kontraktile Proteine handelt (mündliche Mitteilung K.-E. WOHLFARTH-BOTTERMANN).

Verwendet man Äthanol, um die selektive Permeabilität des Plasmalemmas zu zerstören, so ist die Strukturerhaltung besser. Nach HMM-Inkubation kommt es auch zu einer periodischen Verdickung der Filamente, jedoch zu keiner eindeutigen Dekorierung.

Bei der Verwendung von Triton X 100 wurden die besten Ergebnisse erzielt. Bei recht guter Erhaltung der Zellstruktur wurden andeutungsweise dekorierte Filamente gefunden.

Leider konnten mit keiner Methode Mikrofilamente, die am Plastiden oder Plasmalemma inserieren, überzeugend dekoriert werden. Eine optisch klare Darstellung der Pfeilspitzen wird bei konventionell fixiertem und eingebettetem Material von zwei Faktoren ungünstig beeinflusst: Zum ersten können Fixierung und Einbettung einen Abbau und Verlust des HMM-Aktins bewirken, und zum anderen wird eine gute, optische Auflösung der HMM-Pfeilspitzen nur dann erreicht, wenn die Filamente zufälligerweise parallel zur Schnittrichtung liegen. Andernfalls erscheinen sie, trotz erfolgreicher Dekoration, nur aufgeraut. Diese Schwierigkeiten umgeht man durch Anwendung der nachfolgend besprochenen negative staining Technik an gespreiteten Protoplasten.

4.06. Aktin-Identifizierung durch HMM-Dekorierung an gespreiteten Mougeotia-Protoplasten und Trennung des Aktin-HMM-Komplexes durch ATP (ATP-Kontrolle).

Für diese Methode zur Dekorierung von Mougeotia-Mikrofilamenten benötigt man aktinhaltige Cytoplasmatropfen oder Protoplasten, deren Inhalt durch Zerplatzen freigesetzt wird. Da eine mechanische Isolation von Cytoplasma wie bei Nitella (WILLIAMSON 1974; PALEVITZ et al. 1974) oder eine mechanische Herstellung von Protoplasten, etwa wie bei Vaucheria (BLATT et al. 1980), kaum möglich ist, muß die Zellwand enzymatisch entfernt werden.

1977 gelang es MARCHANT und FOWKE, mit Hilfe der Enzyme Cellulysin und Macerase Mougeotia-Protoplasten herzustellen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Algen versagte diese Methode zunächst. Erst als die Algen in einer Durchlüftungskultur nach STABENAU (1978) angezogen wurden, konnte eine reichliche Ausbeute an Protoplasten erzielt werden. Dies hängt wahrscheinlich mit dem schnelleren Zellängenwachstum bei dieser Anzuchtsmethode zusammen. Während bei ENS- und MXS-Kulturen die Zellen sich nur langsam vermehren, wachsen sie unter den Bedingungen der STABENAU-Kultur sehr rasch und teilen sich häufig. Deshalb findet man nach einer anfänglichen Anlaufphase sehr kurze Zellen mit noch schwach ausgebildeten Querwänden. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen in der STABENAU-Kultur sehr jung sind. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, in Zukunft auch für biochemische Fragestellungen, bei denen größere Mengen an Ausgangsmaterial benötigt werden, genügend Mougeotia heranzuziehen.

Läßt man nun die Protoplasten auf mit Poly-L-Ornithin behandelten Netzen festhaften und zerplatzen, so bleibt das Plasmalemma mit daran inserierenden Mikrofilamenten am Grid gebunden. Zellbruchstücke und Aktinfilamente, die nicht oder nicht fest genug am Plasmalemma verankert sind, sowie das G-Aktin werden durch die Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfen an der Grenzfläche

Wasser/Luft gespreitet. Dieses Material kann durch einfaches Abtupfen der Tropfenoberfläche auf ein zweites Grid überführt werden. Bei beiden Verfahren sind Mikrofilamente nachweisbar. Die am Plasmalemma inserierenden Mikrofilamente sind allerdings schlecht darstellbar. Es scheint, als ob noch cytoplasmatisches Material aufgelagert wäre. Dies erklärt auch den größeren Durchmesser dieser Filamente.

Auf dem zweiten Grid findet man neben Bündeln von dicht nebeneinanderliegenden Filamenten auch kurze Filamente, die ohne Vorzugsrichtung verteilt sind. Es scheint, daß die in vivo existierenden Fibrillen als solche erhalten bleiben, die kurzen Filamente jedoch erst auf dem Grid auspolymerisieren (siehe KLEIN, WAGNER und BLATT 1980). Der Zusatz von Phalloidin in der Spülflüssigkeit und die Befilmung des Netzchens mit Poly-L-Ornithin begünstigen eine Polymerisation des G-Aktins zur filamentösen Form (DANCKER et al. 1975; WOHLFARTH-BOTTERMANN und ISENBERG 1976).

Nach HMM-Inkubation zeigen bevorzugt die einzeln liegenden Filamente eine Dekoration. Sie sind ohne Ausnahme nun ca. 21 nm dick und erscheinen aufgerauht. Teilweise ist eine Polarität der Dekorierung feststellbar. Die bevorzugte Dekorierung neu gebildeter Filamente deutet darauf hin, daß diese keine, die Dekoration behindernden assoziierten Proteine besitzen, wie sie bei den in vivo vorhandenen Filamenten zu erwarten sind.

Folgt der HMM-Inkubation eine ATP-Behandlung, so zeigen die Filamente das gleiche Aussehen wie bei der Kontrolle. Sie haben nun ausnahmslos wieder einen Durchmesser von ca. 6 nm und sind glatt.

Damit ist der Beweis erbracht, daß es sich bei den Mikrofilamenten tatsächlich um filamentöses Aktin handelt. Es deutet sich an, daß Aktinfilamente eine kontraktile Verbindung zwischen Plastid und Plasmalemma herstellen. Und tatsächlich zeigen physiologische Versuche, daß Aktin-

inhibitoren die Bewegung des Mougeotia-Chloroplasten hemmen. Deshalb gehen wir davon aus, daß Aktomyosin der chemomechanische Transducer ist.

Hieraus ergeben sich für die Zukunft interessante Fragestellungen. Es müßte geklärt werden, wie die Filamente am Plastiden oder Plasmalemma verankert sind. Es wäre denkbar, daß Aktinin hieran beteiligt ist (siehe auch BRITZ 1979). Ferner muß der Auf- und Abbau der Filamente während der Bewegung noch ausführlich untersucht werden. Dies ist, wie in dieser Arbeit begonnen, mit elektronenoptischen Methoden möglich. Es bietet sich aber auch die elegante Methode der Fluoreszenzmikroskopie an, die eine in vivo Beobachtung ermöglicht. Da fluoreszierendes Anti-Aktin an G- und F-Aktin bindet, fluoreszierendes HMM jedoch nur an Aktinfilamente (POLLARD 1975), sollte auf diese Weise der Polymerisationszustand des Aktins in der Mougeotia-Zelle festzustellen sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Vorversuchen wurden geeignete Fixierungsmethoden für *Mougeotia spec.* erarbeitet; dabei ergaben sich neue Details zur Zellmorphologie.

Es konnte gezeigt werden, daß Mikrofilamente mit dem für F-Aktin typischen Durchmesser im Cytoplasma der *Mougeotia*-Zelle auftreten.

Diese Mikrofilamente könnten aufgrund ihrer räumlichen Beziehung zum Plastiden, ihrer intrazellulären Verteilung und ihres Auf- und Abbaus während der Orientierungsreaktion in der Lage sein, die Bewegung des Plastiden auszuführen.

Typische Plastiden-Gestaltsänderungen, die anhand elektronoptischer Zellquerschnitte rekonstruiert wurden, lassen vermuten, daß starke Zugkräfte auf den Plastiden in der Bewegungsphase einwirken.

Versuche mit NEM (Myosin-ATPase-Hemmstoff), sowie frühere Versuche mit PCMB (SCHÖNBOHM 1969) und Cytochalasin B (WAGNER 1974) deuten darauf hin, daß an der Plastidenbewegung offenbar aktinähnliche kontraktile Proteine beteiligt sind.

Zur Identifizierung der Mikrofilamente als Aktin wurden *Mougeotia*-Protoplasten enzymatisch präpariert und ihr gespreitetes Cytoplasma negativ kontrastiert und mit HMM inkubiert. Die Mikrofilamente zeigen unter diesen Bedingungen eine ATP-reversible HMM-Dekorierung.

Cytosomen, die hochkonzentriert Calcium enthalten (WAGNER und ROSSBACHER 1980), liegen bevorzugt in der Nähe der Plastidenkante. Während der Bewegung reichern sie sich vorübergehend in diesem Bereich noch stärker an. Mitochondrien dagegen verteilen sich unabhängig von Cytosomen.

APM, das bei anderen Objekten Calcium aus Mitochondrien freisetzt, beeinflußt die Plastidenbewegung bei *Mougeotia* nicht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ACHTERRATH, M.: Die Reaktion von Glycerin-extrahierten Protoplastatropfen von *Physarum polycephalum* auf Zugabe von ATP. *Cytobiol.* 1, 169-183 (1969)
- ADELSTEIN, R.S., CHACKO, S., SCORDILIS, S.P., BARYLKO, B., CONTI, M.A. und TROTTER, J.A.: The role of Ca^{2+} and myosin phosphorylation in regulating actomyosin in smooth muscle and non-muscle cells. In: Calcium-Binding Proteins and Calcium Function. WASSERMANN, R.H., CORRADINO, R.A., CARAFOLI, E., KRETSINGER, R.H., MAC LENNAN, D.H., SIEGEL, F.L., North-Holland press, 251-261 (1977)
- AGOSTINI, B. und IVANKOVIC, S.: Different response to phalloidin in rats with various hepatomas. *Naturwiss.* 64, 650 (1977).
- ALLÈRA, A., BECK, R. und WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.-E.: Weitreichende fibrilläre Protoplastdifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplastaströmung. VIII. Identifizierung der Plasmafilamente von *Physarum polycephalum* als F-Actin durch Anlagerung von heavy meromyosin in situ. *Cytobiol.* 4, 437-449 (1971)
- BEGG, D.A., RODEWALD, R. und REBHUHN, L.J.: The visualization of actin filament polarity in thin sections. Evidence for the uniform polarity of membrane-associated filaments. *J. Cell Biol.* 79, 846-852 (1978)
- BETTEX-GALLAND, M. und HUGHES, G.M.: Contractile filamentous material in the pillar of fish gills. *J. Cell Sci.* 13, 359-370 (1973)
- BLATT, M.R. und BRIGGS, W.R.: Blue-light-induced cortical fiber reticulation concomitant with chloroplast aggregation in the alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 147, 355-362 (1980) (a)
- BLATT, M.R., WESSELS, N.K. und BRIGGS, W.R.: Actin and cortical fiber reticulation in the siphonaceous alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 147, 363-375 (1980) (b)
- BLÜM, V. et al.: Biologie. Ein Lehrbuch für Studenten der Biologie. Herausgeber: CZIHAK, G., LANGER, H., ZIEGLER, H.. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1976)
- BRADLEY, M.O.: Microfilaments and cytoplasmic streaming. Inhibition of streaming with cytochalasin. *J. Cell Sci.* 12, 327-343 (1973)
- BRITZ, S.J.: Cytoplasmic Streaming in *Physarum*. In Encyclopedia of plant physiology, Vol. 7, HAUPT, W., FEINLEIB, M.E., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 114-126 (1979)

- BUCKLEY, I.K., RAJU, T.R. und STEWART, M.: Heavy mero-myosin labeling of intermediate filaments in cultured connective tissue cells. *J. Cell Biol.* 78, 644-652 (1978)
- CHEN, J.C.W. und KAMIYA, N.: Localization of myosin in the internodal cell of *Nitella* as suggested by differential treatment with N-ethylmaleimide. *Cell Struct. Funct.* 1, 1-9 (1975)
- CLARKE, S.: The interaction of Triton X-100 with soluble proteins: Possible implications for the transport of proteins across membranes. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 79, 46-52 (1977)
- CONDEELIS, J.S.: The identification of F actin in the pollen tube and protoplast of *Amaryllis belladonna*. *Exp. Cell Res.* 88, 435-439 (1974)
- DANCKER, P., LÖW, I., HASSELBACH, W. und WIELAND, T.: Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 400, 407-414 (1975)
- DE VRIES, J. und WIELAND, T.: Influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin. *Biochem.* 17, 1965-1968 (1978)
- D'HAESE, J. und HINSSEN, H.: Kontraktionseigenschaften von isoliertem Schleimpilzactomyosin. 1. Vergleichende Untersuchungen an Fadenmodellen aus natürlichen, rekombinierten und hybridisierten Actomyosinen von Schleimpilz und Muskel. *Protoplasma* 95, 273-295 (1978)
- DIERKES, U. und STOCKEM, W.: Cytologische und Elektrolyt-histochemische Untersuchungen an gefriersubstituierten Amöben und Schleimpilzen. *Microsc. Acta* 80, 127-144 (1978)
- DIWAN, J.J. und LEHRER, P.H.: Effects on mitochondrial K^+ flux of pH, K^+ concentration, and N-ethyl maleimide. *Membrane Biochem.* 1, 43-60 (1977)
- DIWAN, J.J., MARKOFF, M. und LEHRER, P.H.: Comparison of effects of mersalyl & N-ethyl maleimide on mitochondrial K^+ flux. *Indian J. Biochem. Biophys.* 14, 342-346 (1977)
- DREYER, E.M. und WEISENSEEL, M.H.: Phytochrome-mediated uptake of calcium in *Mougeotia* cells. *Planta* 146, 31-39 (1979)
- FAULSTICH, H., SCHÄFER, A.J. und WECKAUF, M.: The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. chem.* 358, 181-184 (1977)

- FETZER, J.: Über die Beteiligung energieliefernder Stoffwechselprozesse an den lichtinduzierten Chloroplastenbewegungen von *Mougeotia*. Z. Bot. 51, 468-506 (1963)
- FOOS, K.: Licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Zytologie und zum Bewegungsmechanismus des Chloroplasten von *Mougeotia*. Zulassungsarbeit zur Wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an den Gymnasien. Erlangen (1966)
- FOOS, K.: Mikrotubuli bei *Mougeotia spec.*. Z. Pflanzenphysiol. 62, 201-203 (1970)
- FOOS, K.: Untersuchungen zur Feinstruktur von *Mougeotia spec.* und zum Bewegungsmechanismus des Chloroplasten. Z. Pflanzenphysiol. 64, 369-386 (1971)
- FORER, A. und JACKSON, W.T.: Actin in the higher plant *Haemanthus katherinae* Baker. Cytobiol. 10, 217-226 (1975)
- FORER, A. und JACKSON, W.T.: Actin filaments in the endosperm mitotic spindles in a higher plant, *Haemanthus katherinae* Baker. Cytobiol. 12, 199-214 (1976)
- FRANKE, W.W., GRUND, C., FINK, A., WEBER, K., JOCKUSCH, B.M., ZENTGRAF, H. und OSBORN, M.: Location of actin in the microfilament bundles associated with the junctional specialisations between sertoli cells and spermatids. Biol. Cellul. 31, 7-14 (1978)
- GIBBS, S.P.: The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. J. Cell Sci. 35, 253-266 (1979)
- GÖTZ VON OLENHUSEN, K. und WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Evidence for actin transformation during the contraction-relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin: Cycle blockade by phalloidin injection. Cell Tiss. Res. 196, 455-470 (1979)
- HARRIS, W.E. und STAHL, W.L.: Interaction of a new fluorescent reagent with sulphydryl groups of the (Na^+ + K^+)stimulated ATPase. Biochim. Biophys. Acta 426, 325-334 (1976)
- HARTMANN, K.M. und HAUPT, W.: Photomorphogenese. In: Biophysik. Ein Lehrbuch, HOPPE, W., LOHMANN, W., MARKL, H., ZIEGLER, H.. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 449-468 (1977)
- HAUPT, W.: Die Orientierung der Phytochrom-Moleküle in der *Mougeotia*-zelle: Ein neues Modell zur Deutung der experimentellen Befunde. Z. Pflanzenphys. 58, 331-346 (1968)

- HAUPT, W.: Bewegungsphysiologie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1977)
- HAUPT, W.: Sensory transduction and photobehaviors. In: Photoreception and sensory Transduction in Aneural Organisms, LENCI, F., COLOMBETTI, G.. Plenum Press, New York London, 397-404 (1980)
- HAUPT, W. und ÜBEL, H.: Zum Mechanismus der Phytochrom-wirkung bei der Chloroplastenbewegung von Mougeotia. Z. Pflanzenphysiol. 75, 165-171 (1975)
- HAUSER, M.: Demonstration of membrane-associated and oriented microfilaments in Amoeba proteus by means of a Schiff base/glutaraldehyde fixative. Cytobiol. 18, 95-106 (1978)
- HAYAT, M.A.: Principles and techniques of electron microscopy. Biological Applications Volume I. Van Nostrand Reinhold Company, New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne (1970)
- HERTEL, C., QUADER, H., ROBINSON, D.G. und MARME, D.: Anti-microtubular herbicides and fungicides affect Ca^{2+} transport in plant mitochondria. Planta 149, 336-340 (1980)
- HUXLEY, H.E.: Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. J. Mol. Biol. 7, 281-308 (1963)
- ISENBERG, G. und WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Transformation of cytoplasmic actin. Importance for the organization of the contractile gel-reticulum and the contraction-relaxation cycle of the cytoplasmic actomyosin. Cell Tiss. Res. 173, 495-528 (1976)
- ISHIKAWA, H., BISHOFF, R., HOLTZER, H.: Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. J. Cell Biol. 43, 312-328 (1969)
- JACOBSON, G.R. und ROSENBUSCH, J.P.: ATP binding to a protease-resistant core of actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2742-2746 (1976)
- JAHN, W.: Phalloidin hemmt die Bildung eines filamentösen Netzwerkes an der Membran endocytotischer Vakuolen in Leberparenchymzellen. Cytobiol. 15, 452-462 (1977)
- KAJA, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Feinbau der Chromatophoren von Mougeotia spec.. Z. Naturforschung 21b, 379-384 (1966)
- KAMIYA, N.: The mechanism of cytoplasmic movement in a myxomycete plasmodium. Symp. Soc. Exp. Biol. 22, 199-219 (1968)

- KAMIYA, N. und KURODA, K.: Movement of the myxomycete plasmodium. I. A Study of glycerinated models. Proc. Jap. Acad. Sci. 41, 837-841 (1965)
- KLEIN, K.: Untersuchungen zur Rolle des Calciums bei der Bewegung des Mougeotia-Chloroplasten. Zulassungsarbeit f. d. wissenschaftl. Prüf. f. d. Lehramt an den Gymn. in Bay.. Erlangen (1976)
- KLEIN, K., WAGNER, G. und BLATT, M.R.: Heavy-meromyosin-decoration of microfilaments from Mougeotia protoplasts. Planta 150, 354-356 (1980)
- KOMNICK, H., STOCKEM, W. und WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Weitreichende fibrilläre Protoplasma differenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung VII. Experimentelle Induktion, Kontraktion und Extraktion der Plasmafibrillen von Physarum polycephalum. Z. Zellforsch. 109, 420-430 (1970)
- KORN, E.D.: Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (A review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 588-599 (1978)
- LAFOUNTAIN, J.R., ZOBEL, C.R., THOMAS, H.R. und GALBREATH, C.: Fixation and staining of F-actin and microfilaments using tannic acid. J. Ultrastruct. Res. 58, 78-86 (1977)
- LANGENBERG, W.G.: Relative speed of fixation of glutaraldehyde and osmic acid in plant cells measured by grana appearance in chloroplasts. Protoplasma 94, 167-173 (1978)
- LENGSFELD, A.M., LÖW, I., WIELAND, T., DANCKER, P. und HASSELBACH, W.: Interaction of phalloidin with actin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2803-2807 (1974)
- LÜTTGE, U.: Stofftransport der Pflanzen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1973)
- MANNHERZ, H.G. und HOLMES, C.H.: Die molekulare Physiologie der Muskelkontraktion. In: Biophysik. Ein Lehrbuch. HOPPE, W., LOHMANN, W., MARKL, H., ZIEGLER, H.. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 502-513 (1977)
- MARCHANT, H.J.: Actin in the green algae Coleochaete and Mougeotia. Planta 131, 119-120 (1976)
- MARCHANT, H.J. and FOWKE, L.C.: Preparation, culture and regeneration of protoplasts from filamentous green algae. Can. J. Bot. 55, 3080-3086 (1977)
- MARCHANT, H.J. und HINES, E.R.: The role of microtubules and cell-wall deposition in elongation or regenerating protoplasts of Mougeotia. Planta 146, 41-48 (1979)

- MASON, J.W., RASMUSSEN, H. und DIBELLA, F.: 3':5' cAMP and Ca^{2+} in slime mold aggregation. *Exp. Cell Res.* 67, 156-160 (1971)
- MAUPIN-SZAMIER, P. und POLLARD, T.D.: Actin filament destruction by osmium tetroxide. *J. Cell Biol.* 77, 837-852 (1978)
- MEEUSEN, R.L. und CANDE, W.Z.: N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. *J. Cell Biol.* 82, 57-65 (1979)
- MOHR, H.: *Lectures on Photomorphogenesis*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1972)
- MOLLENHAUER, H.H. und MORRÉ, D.J.: Transition elements between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plant cells. *Cytobiol.* 13, 297-306 (1976)
- MOORE, P.L., BANK, H.L., BRISSIE, N.T. und SPICER, S.S.: Association of microfilament bundles with lysosomes in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 71, 659-666 (1976)
- NACHMIAS, V.T., HUXLEY, H.E. und KESSLER, D.: Electron microscope observations on actomyosin and actin preparations from *Physarum polycephalum*, and on their interaction with heavy meromyosin subfragment I from muscle myosin. *J. Mol. Biol.* 50, 83-90 (1970)
- NAGAI, R. und HAYAMA, T.: Ultrastructure of the endoplasmic factor responsible for cytoplasmic streaming in *Chara* internodal cells. *J. Cell Sci.* 36, 121-136 (1979)
- NAGAI, R. und KAMIYA, N.: Movement of the mycomycete plasmodium. II. Electron microscope studies on fibrillar structures in the plasmodium. *Proc. Jap. Acad. Sci.* 42, 934-939 (1966)
- NAGAI, R. und KAMIYA, N.: Movement of the myxomycete plasmodium. VI. Fibrillar structures in the glycine-rated plasmodium. *Proc. Jap. Acad. Sci.* 44, 1044-1047 (1968)
- NEUSCHELER-WIRTH, H.: Wachstumsgeschwindigkeit und Wachstumsrhythmik bei *Mougeotia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 352-369 (1970)
- NULTSCH, W.: *Allgemeine Botanik. Kurzes Lehrbuch für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)
- OBICA, M., MENTER, D.G. TCHEN, T.T. und TAYLOR, J.D.: Actin microfilaments in melanophores of *Fundulus heteroclitus*. Their possible involvement in melanosome migration. *Cell Tiss. Res.* 193, 387-397 (1978)

- PACINI, E. und CRESTI, M.: Close association between plastids and endoplasmic reticulum cisterns during pollen grain development in *Lycopersicon peruvianum*. J. Ultrastruct. Res. 57, 260-265 (1976)
- PALEVITZ, B.A., ASH, J.F. und HEPLER, P.K.: Actin in the green alga, *Nitella*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 363-366 (1974)
- PALEVITZ, B.A. und HEPLER, P.K.: Identification of actin in situ at the ectoplasm-endoplasm interface of *Nitella*. J. Cell Biol. 65, 29-38 (1975)
- PÄTAU, K.: Eine neue X^2 -Tafel. Z. f. Vererbungslehre 80, 558-564 (1942)
- PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. 63, 152-168 (1943)
- POLLARD, T.D.: Functional implications of the biochemical and structural properties of protoplasmic contractile proteins. In: Molecules and Cell Movement. INOUE, S., STEPHENS, R.E., Raven Press New York, 259-286 (1975)
- POLLARD, T.D. und MAUPIN, P.: Electron microscopy of cytoplasmic contractile proteins. In: Ninth Internat. Congress on Electr. Microsc. Vol. III, 606-614, Toronto (1978)
- POLLENDER, J.-M. und GRUDA, J.: Effect of phalloidin on actin proteolysis as measured by viscometry and fluorimetry. Can. J. Biochem. 57, 49-55 (1979)
- PORTER, K.R. und KALLMAN, F.: The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Exp. Cell Res. 4, 127-141 (1953)
- PRINCE, W.T., RASMUSSEN, H.D. und BERRIDGE, M.J.: The role of calcium in fly salivary gland secretion analyzed with the ionophore A-23187. Biochim. Biophys. Acta 329, 98-107 (1973)
- PUISEUX-DAO, S. und LEVAIN, N.: Étude cytologique d'un Mougeotia, (Conjugatophycées). J. Microsc. 2, 461-484 (1963)
- QUADER, H., CHERNIAK, J. und FILNER, P.: Chemically induced shortening of flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. (Suppl.) 59, 19 (1977)
- QUADER, H., CHERNIAK, J. und FILNER, P.: Participation of calcium in flagellar shortening and regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*. Exp. Cell Res. 113, 295-301 (1978)

- QUADER, H. und FILNER, P.: The action of antimittotic herbicides on flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*: a comparison with the action of colchicine. *Europ. J. Cell Biol.* 21, 301-304 (1980)
- REED, P. und LARDY, H.: A 23187: A divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.* 247, 6970-6977 (1972)
- REINHOLD, M. und STOCKEM, W.: Darstellung eines ATP-sensitiven Membransystems mit Ca^{2+} -transportierender Funktion bei Amöben. *Cytobiol.* 6, 182-194 (1972)
- RENAUDIN, S. und CAPDEPON, M.: Association of the endoplasmic reticulum and the plastids in *Tozzia alpina* L. scale leaves. *J. Ultrastruct. Res.* 61, 303-308 (1977)
- RINALDI, R., OPAS, M. und HREBENDA, B.: Contractility of glycerinated *Amoeba proteus* und *Chaos chaos*. *J. Protozool.* 22, 286-292 (1975)
- ROBINSON, D.G.: Dictyosome-endoplasmic reticulum associations in higher plant cells? *Europ. J. Cell Biol.* 23, 22-36 (1980)
- ROSSBACHER, R.: Röntgenmikroanalytische Untersuchungen zur Kompartimentierung von Calcium und anderer Ionen bei der Grünalge *Mougeotia spec.*. Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg (1978)
- SCHIMASSEK, H. und JECKEL, D.: Wirkung von Phalloidin auf Leberzellen: Bindung, Strukturveränderung und Elimination. *Cytobiol.* 17, 73-83 (1978)
- SCHLIEPER, P. und DE ROBERTIS, E.: Triton X-100 as a channel-forming substance in artificial lipid bilayer membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 204-208 (1977)
- SCHÖNBOHM, E.: Die Hemmung der lichtinduzierten Bewegung des *Mougeotia*-Chloroplasten durch p-Chlormercuribenzoat (Versuche zur Mechanik der Chloroplastenbewegung). *Z. Pflanzenphysiol.* 61, 250-260 (1969)
- SCHORER-MÖRTEL, G.: Reversible Form- und Volumenänderungen des *Mougeotia*-Chloroplasten. I. Die Kontraktion im Starklichtbereich. *Z. Pflanzenphysiol.* 68, 144-169 (1972a)
- SCHORER-MÖRTEL, G.: Reversible Form- und Volumenänderungen des *Mougeotia*-Chloroplasten. II. Die Kontraktion im Schwachlichtbereich und in Dunkelheit sowie Beziehungen zu den Orientierungsbewegungen. *Z. Pflanzenphysiol.* 68, 193-214 (1972b)
- SIMIONESCU, N. und SIMIONESCU, M.: Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 70, 608-621 (1976)

- SMALL, J.V.: Contractile units in vertebrate smooth muscle cells. *Nature* 249, 324-327 (1974)
- SOMEYA, A. und TANAKA, N.: Heavy meromyosin- and ATP-binding protein from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 101, 166-168 (1979)
- SPOONER, B.S. und WESSELS, N.K.: Effects of cytochalasin B upon microfilaments involved in morphogenesis of salivary epithelium. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66, 360-364 (1970)
- SPUDICH, J.A.: Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. II. Purification, properties and membrane association of actin from amoebae of *Dictyostelium discoidum*. *J. Biol. Chem.* 249, 6013-6020 (1974)
- SPURR, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43 (1969)
- STABENAU, H.: Microbodies from *Spirogyra*. Organelles of a filamentous alga similar to leaf peroxisomes. *Plant Physiol.* 58, 693-695 (1976)
- STABENAU, H.: Wachstum von *Mougeotia* in der Durchlüftungskultur. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 91, 251-255 (1978)
- STABENAU, H.: Lokalisation von Enzymen des Glykolatstoffwechsels in den Zellen von *Mougeotia*. Botanikertagung Bochum (1980), im Druck
- STOCKEM, W. und KLEIN, H.-P.: Pinocytosis and locomotion in amoebae. XV. Demonstration of Ca^{++} -binding sites during induced pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 100, 33-43 (1979)
- STOCKEM, W., WEBER, K. und WEHLAND, J.: The influence of microinjected phalloidin on locomotion, protoplasmic streaming and cytoplasmic organization in *Amoeba proteus* and *Physarum polycephalum*. *Cytobiol.* 18, 114-131 (1978)
- SZENT-GYÖRGYI, A.G.: Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys. J.* 15, 707-723 (1975)
- TAKAHASHI, M., SUZUKI, H. und YAMAMOTO, I.: A formaldehyde-osmium tetroxide mixture and a formaldehyde-glutaraldehyde-osmium tetroxide mixture as fixative for electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 27, 149-151 (1978)
- THIÉRY, J.P.: Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* 6, 987-1018

- VENABLE, J.H. und COGGESHALL, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25, 407-408 (1965)
- WACHTER, W.: Untersuchungen über den wirksamen Absorptionsgradienten bei der Drehung des Mougeotia-Chloroplasten. Zulassungsarbeit f. d. wissenschaftl. Prüf. f. d. Lehramt an den Gymn. in Bay.. Erlangen (1979)
- WAGNER, G.: Ionenflüsse und Phytochrom-abhängige Chloroplastenbewegung bei Mougeotia spec.. Dissert. Tübingen (1974)
- WAGNER, G.: Some physiological properties of phytochrome in the alga Mougeotia, as studied by cytochalasin B and aminophylline. In: Proc. Annu. Eur. Symp. Plant Photomorphogenesis. DE GREEF, J.A.. University Press Antwerpen, 22-25 (1974)
- WAGNER, G.: Actomyosin as a basic mechanism of movement in animals and plants. In: Encyclopedia of plant physiology, Vol. 7, HAUPT, W., FEINLEIB, M.E., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 114-126 (1979)
- WAGNER, G. und BELLINI, E.: Light-dependent fluxes and compartmentation of calcium in the green alga Mougeotia. *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 283-291 (1976)
- WAGNER, G., HAUPT, W. und LAUX, A.: Reversible inhibition of chloroplast movement by Cytochalasin B in the green alga Mougeotia. *Science* 176, 808-809 (1972)
- WAGNER, G. und KLEIN, K.: Differential effect of calcium on chloroplast movement in Mougeotia. *Photochem. Photobiol.* 27, 137-140 (1978)
- WAGNER, G. und ROSSBACHER, R.: X-ray microanalysis and chlorotetracycline staining of calcium vesicles in the green alga Mougeotia. *Planta* 149, 298-305 (1980)
- WARIS, H.: The significance for algae of chelating substances in the nutrient solutions. *Physiol. Plant.* 6, 538-543 (1953)
- WARTENBERG, A.: Systematik der niederen Pflanzen. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1972)
- WEBER, K., RATHKE, P.C., OSBORN, M. und FRANKE, W.W.: Distribution of actin and tubulin in cells and in glycerinated cell models after treatment with cytochalasin B (CB). *Exp. Cell Res.* 102, 285-297 (1976)
- WEHLAND, J., STOCKEM, W. und WEBER, K.: Cytoplasmic streaming in Amoeba proteus is inhibited by the actin-specific drug phalloidin. *Exptl. Cell Res.* 115, 451 (1978)

- WESSELS, N.K., SPOONER, B.S., ASH, J.F., BRADLEY, M.O., LUDUENA, M.A., TAYLOR, E.L., WRENN, J.T. and YAMADA, K.M.: Microfilaments in cellular and developmental processes. *Science* 111, 135-143 (1971)
- WIELAND, T.: Phallotoxins and microfilaments. 26. Colloquium Mosbach 1975. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 203-214 (1976)
- WIELAND, T.: Modification of actins by phallotoxins. *Naturwiss.* 64, 303-309 (1977)
- WILLIAMSON, R.E.: Actin in the alga, *Chara corallina*. *Nature* 248, 801-802 (1974)
- WILLIAMSON, R.E.: Actin and motility in plant cells. In: *Contractile Systems in Non-Muscle Tissues*, Perry et al. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 91-101 (1976)
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. *Naturwiss.* 44, 287-288 (1957)
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Cell structures and their significance for ameboid movement. *Int. Rev. Cytol.* 16, 61-131 (1964)
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Cytoplasmatische Actomyosine und ihre Bedeutung für Zellbewegungen. Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften. Vorträge N. 269. Westdeutscher Verlag (1977)
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. und ISENBERG, G.: Dynamics and molecular basis of the contractile system of *Physarum*. In: *Contractile Systems in Non-Muscle Tissues*, PERRY et al., Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1976)
- YAMAGUCHI, M., NAKAMURA, T. und SEKINE, T.: Studies on the fast reacting sulfhydryl group of skeletal myosin A: Conversion to smooth muscle myosin type with N-ethylmaleimide treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 328, 154-165 (1973)
- ZURZYCKI, J.: The mechanism of the movements of plastids. *Z. Pflanzenphysiol.* 18, 940-978 (1962)

Herrn Prof.Dr.G.Wagner und Herrn Prof.Dr.W.Haupt danke ich sehr für die Anregung zu dieser Arbeit und für Ihre Hilfe.

Herr Dr.K.P.Gaffal wies mich geduldig in die Arbeit am Elektronenmikroskop ein; an dieser Stelle möchte ich Ihm danken.

Herrn Prof.Dr.K.E.Wohlfarth-Bottermann und Herrn Dr.H.Hinssen (Universität Bonn) verdanke ich viele interessante Diskussionen und experimentelle Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 25. Februar 1951 wurde ich als Tochter des Facharbeiters Gerhard Weigang und seiner Ehefrau Frieda, geb. Sticker, in Nürnberg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Kraftshof bei Nürnberg (1957 - 1961) trat ich 1961 in das Labenwolf-Gymnasium in Nürnberg ein, wo ich im Sommer 1970 mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloß. Zum Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Universität Erlangen-Nürnberg und begann mit dem Studium der Fächer Biologie und Chemie. Im Sommer 1976 legte ich die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie ab und begann die vorliegende Dissertation. Vom 1. Januar 1977 bis 31. Dezember 1979 hatte ich eine von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanzierte Teilzeit-Stelle als wissenschaftliche Mitarbeiterin inne.

